



HAL
open science

Développement et caractérisation de nouveaux modèles murins de maladie à corps de Lewy

Estelle Schueller

► **To cite this version:**

Estelle Schueller. Développement et caractérisation de nouveaux modèles murins de maladie à corps de Lewy. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ018 . tel-03501900

HAL Id: tel-03501900

<https://theses.hal.science/tel-03501900>

Submitted on 23 Dec 2021

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED 414)

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (UMR 7364)

THÈSE présentée par :

Estelle SCHUELLER

soutenue le 29 juin 2020

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : **Neurosciences**

**Développement et caractérisation de
nouveaux modèles murins de maladie à corps
de Lewy**

THÈSE dirigée par :

Anne-Laurence BOUTILLIER

Directrice de Recherches, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Claire PAQUET

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Université Paris-Diderot,

APHP, Hôpital Lariboisière Fernand-Widal

Stéphane HUNOT

Directeur de Recherches, Université de Paris-Sorbonne
Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (ICM)

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Frédérique RENE

Maître de Conférences, Université de Strasbourg

MEMBRE INVITE :

Olivier BOUSIGES

**Maître de Conférences des Universités – Praticien
Hospitalier**, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Remerciements

Durant ces années de thèse, j'ai eu la chance d'être accompagnée, écoutée, et soutenue par un grand nombre de personnes. Je tiens donc à remercier tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin au cours de mon parcours de thésarde, et parfois même sans s'en rendre compte.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, les docteurs Claire PAQUET, Frédérique RENE, et Stéphane HUNOT qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

J'aimerais également remercier notre cher directeur, le Pr. Jean-Christophe CASSEL, pour m'avoir accueillie au laboratoire bien sûr, pour m'avoir aidée avec les galères des moteurs de la fameuse plateforme Atlantis, et pour m'avoir fait rire à de nombreuses reprises notamment en réunion d'équipe (Ah sacré Patoche quand même !)

Laurette je t'adresse mes plus profonds remerciements pour ces années de thèse. C'est grâce à toi et Olivier que j'ai pu réussir le concours de l'école doctorale et travailler sur ce projet qui me tenait particulièrement à cœur. Merci bien entendu pour les nombreuses discussions à propos de notre projet (qui n'aura pas toujours suivi le chemin auquel on aurait pu s'attendre) et les relectures et corrections de la thèse.

Un merci tout particulier à toi Olivier, pour tout. Merci pour toutes ces discussions qu'on a eu autour de la thèse, du boulot et de l'avenir, merci de m'avoir écoutée quand c'était un peu la panique, et de m'avoir permis de décompresser quand le vase était prêt à déborder. Merci bien sûr pour ton aide lors de la rédaction et les précieuses relectures. On a aussi pas mal rigolé durant ces 4 années ! Je suis plus qu'heureuse d'avoir été ta première thésarde, j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes ! *Bon je parle peut-être un peu beaucoup, mais tu avais été entraîné avec Marie comme voisine de bureau !* Je te souhaite le meilleur pour tout ce qu'il y a à venir, et j'espère que tu t'épanouiras encore plus dans la suite de ta carrière.

Merci à Frédéric Blanc pour avoir cru en ce projet et pour toutes les discussions intéressantes et enrichissantes que nous avons pu avoir.

Merci au Dr. Paolo Giacobini et à Gaëtan qui m'ont permis de découvrir la technique de transparisation et de m'émerveiller sur les résultats obtenus avec cette méthode !!!

Merci à Chantal pour tes conseils avisés sur le comportement et pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse, deux fois, et pour l'aide que cela m'a apportée.

Merci à Carole de t'être occupée de mes nombreuses petites souris.

Merci à Jonathan pour le temps que tu as passé pour l'extraction de mes dernières données de piscine. Cela m'a fait gagner un temps précieux sur la fin de mes analyses !

Merci aux stagiaires qui ont travaillé sur ce projet : Loïc et Hugo, et surtout Kelly pour les beaux résultats de Western blot que je peux présenter dans ma thèse.

Thank you Rafa and Isabel for being so kind and cheerful, and also being so interested and encouraging about my work. Thank you Isabel and Karine M. for letting me borrow your thunderbolt adapter for all my labmeetings !!!

Merci à la team clope : Laura, David, Romain, Aurélie et Bibi (et même parfois Karine notre fumeuse passive). Merci pour ces moments de pauses partagés, les discussions, les rires et la bonne humeur, ou alors les petits coups de gueules (parce que oui râler ça fait du bien parfois). David je regrette toujours qu'on n'ait jamais réussi à être synchro sur le port du t-shirt Rick et Morty, ce sera compliqué maintenant que tu es parti à NYC ! Romain B., merci pour ta bonne humeur à toute épreuve. Je suis certaine que faire des blagues sur mon manteau d'« exhibitionniste » comme tu l'appelles te manquera... Merci Laura D. pour tous les petits coups de main que tu m'auras filé avec Illustrator ou le nanozoomer, pour les moments partagés autour des bières, ou des pizzas... ou les deux !

Bien entendu je ne peux pas écrire ces remerciements sans remercier la team « filles » du labo ! Amélie, Aurélie, Caro, Laurie et Marie, merci pour tous les bons moments passés ensemble, les soirées filles autour de plein de bonnes choses à manger, les discussions plus ou moins sérieuses, et les rires. Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous.

Caro, depuis notre bureau à la mezzanine jusqu'à notre bureau de thèse, on en aura partagé des choses : l'Odeur avec un grand O, les karaokés improvisés (Mamaaaa, just killed a maaan), les pétages de câble (vive le comportement), les nombreux fous rires (la poire et bien sûr... 1987 !!!). Merci d'avoir été là quand ça n'allait pas, et quand ça allait aussi d'ailleurs ! Et merci de m'avoir rassurée tout au long de cette thèse, et particulièrement sur la fin !

Merci Aurélie pour ton écoute, pour ton humour à deux balles que j'adore, et pour les « allé hop ! » qui manquent au labo depuis que tu es partie ! Ma petite Alsacienne de poche, et c'est le cas de le dire !!! Hahaha désolée j'étais obligée...

Merci Amélie, tu sais que sans toi, j'aurais certainement bousillé une grande partie de mes Western blot en stage de master si j'avais écouté d'autres conseils un peu douteux ! Merci aussi pour les fous rires des soirées « ApéroGame » que tu organisais au labo (encore désolée pour le totem du jungle speed dans la tête...) Et merci d'être très souvent l'initiatrice des rassemblements de notre club de petites commères.

Merci Marie pour m'avoir tant fait rire, à aborder n'importe quel sujet sans aucune gêne, et pour ton rire (je l'ai déjà dit ?!). Non mais vraiment, ce rire communicatif qu'on pouvait entendre à travers tout le labo a vraiment manqué cette dernière année ! Je suis sûre qu'Olivier approuve ! Merci aussi pour les petites discussions qui m'ont rassurées sur la fin de cette thèse.

Merci Laurie d'avoir débarqué tel un petit OVNI au labo la même année que moi (où devrais-je remercier quelqu'un d'autre dont le nom rime avec « éclair » ?), ma petite mamie

dans un corps de jeune athlète qui tricote devant Louis la Brocante... Merci pour ta sensibilité et ton humour.

Un énorme merci aux « mamans du labo » comme on aime les appeler, Bibi et Karinette, pour votre travail déjà, mais surtout pour vos sourires, les papotages et les fous rires. Merci pour les beaux moments qu'on a partagé, que ce soit sur les marches du labo ou au marché de Noël. Un grand merci à toi Brigitte pour tout ce que tu as fait pour ma thèse et tout ce que tu m'as appris : les immunos, les perfusions, les chirurgies (qui auraient été beaucoup moins fun sans toi et Linkin Park). Tu m'auras aussi appris que parfois un petit chouïa ce n'est pas si mal que ça ! Et puis surtout merci pour ton soutien sans faille et merci de m'avoir écoutée râler encore et encore... Karinette merci pour les « petits kiffes », j'ai encore en souvenir une certaine tablette de chocolat posée sur mon bureau un matin... Et courage pour le cryostat, tu vaincras l'entorhinal, je crois en toi !!! Enfin bref, un beau bureau rempli de belles personnes ! Vous allez me manquer !

Merci à toi Catherine, encore une maman du labo ! Merci pour ton sourire lorsqu'on entre dans le laboratoire ou qu'on te croise dans les couloirs, à croire que tu es toujours de bonne humeur ! Merci pour toutes les démarches que tu auras faites pour moi au cours de la thèse, et pour le travail de l'ombre que tu réalises tous les jours.

Merci aussi aux « anciens » du labo : Etienne pour les discussions partagées, notamment sur « l'après thèse », Aude pour t'être si bien occupée de nos petites souris au début de ma thèse, Victor, Valentine, Déborah, et Christian. Merci à Damien pour les nombreuses soirées bières au Milano ou sushis chez toi. Merci Bastien pour les bons moments partagés dans notre bureau à la mezzanine, et les petites visites au laboratoire avec Olia.

Je remercie bien évidemment les plus « jeunes » doctorants, Caroline, Gaëlle, Marion, Laura T., Christopher, et Ali. Bon courage pour la suite, tenez bon, la fin est (très) proche !

J'aimerais enfin remercier tous les membres de l'équipe 1 et du LNCA que je n'ai pas cités. Vincent merci encore d'avoir accepté de te déguiser en père Noël l'année de notre arrivée au laboratoire, je sais que ça t'a beaucoup plu ! Bon courage pour la suite ! Aline, tu m'as fait beaucoup rire durant ces années au laboratoire. Pascal, en plus d'avoir été un super prof, merci pour ta gentillesse et pour m'avoir fait souvent rire pendant cette thèse. « Olaaaa » Katia ! Merci pour ton sourire et ta gentillesse. Merci à Olivier et Georges pour vous êtres occupés de mes souris.

Un gigantesque merci à mes amis, les meilleurs, la team « bières », pour être géniaux tout simplement : Morgane, Emma, Mathilde, Ju, Vincent, Arnaud, Paula, Kris, Max, Robin, Jo, Bewoerly, Cooncoon, et les expatriés John et Juliette, ainsi que Boubou et Mary. Vous m'avez permis de me changer les idées autour de quelques bières (et de madeleines...), papotages,

soirées raclettes ou karaokés. Merci particulièrement à ceux qui m'ont fait remarquer que ma thèse n'était pas la pire (Vincent, big up à toi). Vous savez que je vous aime ça ne sert à rien que je m'étale !

Merci à mes amies d'amour et de longue date Perrine, Emilie, Laure, Lolo, Aurore d'être toujours là après toutes ces années (une moyenne de 16 ans ce n'est pas mal quand même !).

En plus de tout ça, j'ai la chance d'avoir une famille formidable, alors rien que pour ça je suis reconnaissante ! Maman et papa, merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir soutenue dans mes choix, d'avoir cru en moi. Je sais que je peux compter sur vous pour quoi que ce soit, et je ne pourrais pas espérer de meilleurs parents. Merci mamie d'être la meilleure mamie qu'on puisse avoir. Philippe, Nico et Clo, merci de me supporter depuis toutes ces années (mais bon ça va je suis sympa comme sœur). Merci à Marie et Anne, mes belles sœurs adorées, qui me supportent également (j'étais incluse dans le pack familial, vous le saviez). Merci à ma nièce Ilianna de m'enchanter de ses sourires et de ses rires. Je vous aime tous.

Et enfin un merci tout particulier à toi Julien. Tu dois être soulagé de me voir arriver au bout de cette thèse, ou devrais-je dire de NOUS voir arriver au bout de cette thèse ! Merci de m'avoir supportée, avec mes sautes d'humeur, mes coups de stress et mes angoisses. Merci surtout d'avoir été un pilier, de m'avoir soutenue et poussée à me dépasser ces derniers mois (et ce n'est pas facile quand on sait que « quand tu me pousses, je roule » !). Merci de me faire rire, depuis le début, et d'être là tout simplement.

Table des matières

I. Introduction	1
A. La maladie à corps de Lewy	3
1. Epidémiologie	3
a) Les chiffres.....	3
b) Etiologie et facteurs de risque.....	4
2. Symptômes de la MCL	6
a) Chevauchement des caractéristiques cliniques	6
b) Critères diagnostics	6
(1) Fluctuations cognitives	9
(2) Hallucinations visuelles.....	9
(3) Troubles du comportement en sommeil paradoxal	10
(4) Syndrome parkinsonien.....	10
c) Sensibilité et spécificité des critères diagnostics.....	11
3. Anatomopathologie	11
a) Les corps de Lewy et neurites de Lewy	11
b) Evaluation de la pathologie Lewy	12
c) L'insula.....	14
(1) L'insula chez l'Homme	14
(2) L'insula chez le rongeur	16
4. Stratégies thérapeutiques	18
a) Les traitements symptomatiques.....	18
(1) Traitement des symptômes cognitifs	18
(2) Traitement des symptômes psychiatriques.....	19
(3) Traitement des symptômes moteurs	19
b) L' α -syn comme cible thérapeutique.....	20
(1) Réduire la synthèse d' α -syn.....	20
(2) Augmenter la dégradation de l' α -syn	21
(3) Empêcher l'agrégation de l' α -syn	21
(4) Empêcher la propagation de l' α -syn.....	21
(5) L'immunisation active contre l' α -syn.....	22
B. L'α-synucléine	23
1. Découverte de l' α -synucléine	23
2. Structure de l' α -syn	24
3. Fonctions physiologiques de l' α -syn.....	27
a) Rôle de l' α -syn au niveau synaptique.....	27
(1) Régulation du pool de vésicules d'exocytose	27
(2) Chaperonne du complexe SNARE	28
(3) Rôle de l' α -syn dans l'endocytose	29
b) Rôle de l' α -syn dans le noyau.....	30
c) Rôle de l' α -syn dans le cytoplasme	31
(1) Métabolisme de la dopamine et neurones dopaminergiques.....	31
(2) Rôle de chaperonne.....	31

4.	Pathologie de l'α-syn	33
a)	Mutations, surexpressions et modifications post-traductionnelles	33
(1)	Mutations et surexpressions d'α-syn.....	33
(2)	Modifications post-traductionnelles	35
b)	Agrégation et formes pathologiques de l'α-syn	37
(1)	Agrégation de l'α-syn.....	37
(2)	Conformations pathologiques de l'α-syn.....	39
(3)	Perte de fonction ou gain de fonction toxique ?	42
(4)	Toxicité de l'α-syn	42
c)	L'α-syn et l'hypothèse prion	44
(1)	La naissance de l'hypothèse	44
(2)	La pathologie et la propagation de type prion	45
(3)	Les voies de propagation de l'α-syn	46
d)	Modèles murins d'expression de l'α-syn	48
(1)	Les modèles animaux.....	48
(2)	Modèles transgéniques α-syn.....	50
(3)	Modèles par injection d'α-syn pathogène	52
C.	La mémoire	57
1.	Les systèmes de mémoires	57
2.	Mémoire à long terme et ses sous systèmes.....	59
a)	La mémoire déclarative	59
(1)	La mémoire sémantique	60
(2)	La mémoire épisodique	60
b)	La mémoire non déclarative.....	60
3.	La mémoire à l'échelle des réseaux.....	61
a)	L'encodage	62
b)	La consolidation.....	63
(1)	Consolidation synaptique	63
(2)	Consolidation systémique.....	63
c)	Rappel.....	67

II. Objectifs de la thèse71

III. Matériel & méthode75

A.	Animaux	77
1.	Généralités	77
2.	Le modèle SNCA	77
B.	Injection de fibrilles d'α-syn par chirurgie stéréotaxique	78
1.	Principe de la chirurgie stéréotaxique	78
2.	Dispositif	79
3.	Protocole expérimental	79
a)	Mise au point des coordonnées stéréotaxiques pour le cortex insulaire antérieur (CI ant)	82
b)	Injections des fibrilles d'α-syn dans le CI ant	82
c)	Injections des fibrilles d'α-syn dans le striatum	83
4.	Les modèles fibrilles	83

a)	SNCA fibrilles (SNCA FIB)	83
b)	WT fibrilles (WT FIB)	83
C.	Tests comportementaux	84
1.	Manipulation des souris	84
2.	Labyrinthe en croix surélevé.....	85
a)	Dispositif et principe.....	85
b)	Protocole expérimental.....	85
3.	Activité locomotrice spontanée.....	86
a)	Dispositif et principe.....	86
b)	Protocole expérimental.....	87
4.	Test de la piscine de Morris.....	87
a)	Dispositif et principe.....	87
b)	Protocole expérimental.....	87
5.	Tests de mémoires de reconnaissances d'objets	89
a)	Principe du test.....	89
b)	Dispositif expérimental	90
c)	Protocole expérimental.....	91
6.	Nesting.....	94
a)	Dispositif et principe.....	94
b)	Protocole expérimental.....	95
7.	Test de détection d'odeur : nourriture enfouie (« buried food »).....	96
a)	Dispositif et principe.....	96
b)	Protocole expérimental.....	96
8.	Test d'apprentissage d'un nouveau goût (« novel taste learning »)	97
a)	Dispositif et principe.....	97
b)	Protocole expérimental.....	97
9.	Evaluation des troubles gastrointestinaux (constipation)	98
a)	Dispositif et principe.....	98
b)	Protocole expérimental.....	98
10.	Test de franchissement de la barre	99
a)	Dispositif et principe.....	99
b)	Protocole expérimental.....	99
D.	Analyse anatomopathologique	100
1.	Mise à mort et préparation des tissus	100
a)	Dissection	100
b)	Perfusion intracardiaque et cryostat.....	100

2.	Analyse moléculaire de l'expression protéique.....	101
a)	Extraction des protéines totales.....	101
b)	Western blot.....	101
3.	Histologie.....	103
a)	Coloration au Crésyl Violet.....	103
b)	Immunohistochimie.....	104
c)	Immunofluorescence.....	105
d)	Transparisation iDISCO et immunomarquage du tissu cérébral.....	105
E.	Statistiques.....	107

IV. Résultats - Partie I.....109

A.	Vérification du profil d'expression du transgène.....	113
1.	Expression du transgène dans les structures cérébrales des souris SNCA.....	113
2.	Mesures des couches cellulaires CA1, CA3 et du GD dans l'HD.....	113
B.	Pathologie α-syn phosphorylée.....	115
1.	Taux d'expression de l' α -syn phosphorylée sur la sérine 129.....	115
2.	Marquage immunohistochimique α -syn pS129.....	115
C.	Caractérisation comportementale du modèle SNCA à 12-14 mois.....	118
1.	Test de la mémoire spatiale dépendante de l'HD.....	118
a)	Test de la mémoire spatiale de référence en piscine de Morris.....	118
b)	Test de localisation d'objet.....	119
2.	Tests de reconnaissance d'objets.....	121
a)	Reconnaissance de nouvel objet.....	121
b)	« Object-in-place ».....	122
c)	Mémoire de l'ordre temporel.....	122
d)	Reconnaissance de nouvel objet aux délais 5 min et 2 h 20 min.....	125
3.	Capacités olfactives.....	125
4.	Apprentissage d'un nouveau goût.....	125
5.	Nesting.....	125
6.	Activité locomotrice spontanée.....	126
7.	Evaluation de la coordination motrice.....	126
D.	Evaluation des atteintes synaptique, neuronale et gliale des souris SNCA à 14 mois.....	126
1.	Marqueurs synaptiques et axonal.....	127
2.	Marqueurs neuronal et glial.....	127

V. Résultats cliniques.....129

A.	Résultats de l'évaluation neuropsychologique de patients au stade prodromal de la MCL... 131	
1.	Rappel Libre / Rappel Indicé – 16 items.....	131
2.	Batterie Rapide d'Efficiency Frontale.....	131

3.	Delayed Matching to Sample test – 48 items	132
B.	Méthodologie pour l'évaluation neuropsychologique des patients pro-MCL	133
1.	Rappel Libre / Rappel Indicé – 16 items	133
2.	Batterie Rapide d'Efficiency Frontale	134
3.	Delayed Matching to Sample test – 48 items	134

VI. Discussion – Partie I135

A.	Le modèle SNCA à 14 mois : une atteinte privilégiée du CF	137
1.	Anatomopathologie.....	137
a)	Les souris SNCA âgées de 14 mois présentent une pathologie α -syn pS129 dans le CF et l'HD .	137
b)	Les souris SNCA âgées de 14 mois présentent une diminution de certains marqueurs synaptiques et axonal dans le CF	140
c)	Les souris SNCA âgées de 14 mois présentent une atteinte astrogliale dans le CF, et peut être neuronale.....	141
d)	L'HD chez les souris SNCA âgées de 14 mois	142
2.	Phénotype comportemental	143
a)	Altération de la mémoire à long terme ancienne chez les souris SNCA âgées de 14 mois	143
b)	Déficits dans des tâches de mémoire de reconnaissance dépendantes du CPFm, du Cx EntL, et du Cx PRh	143
c)	Les souris SNCA ne présentent pas de déficits olfactifs ou gustatifs majeurs.....	144
d)	Les souris SNCA ne présentent pas d'altération motrice majeure à 18 mois.....	145
B.	Pertinence du modèle SNCA.....	146
1.	Résultats neuropsychologiques de patients atteints de MCL au stade prodromal	146
2.	Le modèle SNCA : un bon modèle ?.....	146
a)	Modèle SNCA et homologie	147
b)	Modèle SNCA et isomorphisme.....	148

VII. Résultats – Partie II151

A.	Mise au point des injections stéréotaxiques de fibrilles d'α-syn	155
1.	Vérification de la capacité des fibrilles à entraîner une pathologie α -syn dans le striatum dorsal	155
2.	Mise au point des coordonnées d'injection dans le cortex insulaire antérieur.....	157
B.	Développement et caractérisation du modèle SNCA fibrilles	161
1.	Caractérisation comportementale des souris SNCA FIB âgées de 12 à 14 mois (7-9 mois p.i.)	162
a)	Evaluation de l'anxiété grâce au labyrinthe en croix surélevé	162
b)	Evaluation de la mémoire spatiale de référence dépendante de l'HD.....	162
c)	Evaluation de deux types de mémoire de reconnaissance : RNO et OiP.....	167
d)	Test du nouveau goût.....	169
e)	Evaluation des troubles gastrointestinaux	170
f)	Evaluation de la capacité à construire son nid : tâche de « nesting »	171
g)	Evaluation de l'activité locomotrice	172
h)	Evaluation de la coordination motrice grâce au test de la barre	172

2.	Cartographie de la pathologie α -syn induite par l'injection bilatérale des fibrilles.....	174
C.	Analyse de propagation de la pathologie α-syn après injection unilatérale de fibrilles d'α-syn dans le cerveau de souris WT	178
1.	Propagation de la pathologie α -syn à partir du striatum dorsal.....	178
a)	Immunohistochimie DAB α -syn pS129 sur coupes frontales.....	178
b)	Immunofluorescence α -syn pS129 sur cerveau transparisé.....	180
c)	Co-marquages de la pathologie α -syn pS129 avec des marqueurs neuronal (NeuN) et astrocytaire (GFAP)	181
2.	Propagation de la pathologie α -syn à partir du CI ant.....	183
a)	Observation d'une propagation au sein de l'insula 4 mois p.i.	183
b)	Visualisation en 3D de la propagation de la pathologie α -syn 7 mois p.i. et 12 mois p.i. de fibrilles d' α -syn	185
(1)	Structures cérébrales affectées par la pathologie α -syn pS129 7 mois p.i. dans le CI ant	187
(2)	Structures cérébrales affectées par la pathologie α -syn pS129 12 mois p.i. dans le CI ant ...	189
VIII.	Discussion – Partie II.....	193
A.	Propagation de la pathologie α-syn pS129.....	195
1.	Propagation diffuse de la pathologie α -syn pS129 dans le cerveau à partir de l'injection de fibrilles dans le CI ant de souris WT	195
2.	Propagation de la pathologie α -syn chez les souris SNCA 9 mois après l'injection bilatérale de fibrilles dans le CI ant	198
3.	La pathologie peut être initiée en dehors du CI ant	200
4.	Caractérisation de la pathologie induite par les fibrilles	200
B.	Aucune altération comportementale n'est induite par l'injection de fibrilles dans le CI ant chez les souris SNCA FIB	201
1.	Discussion des paramètres de l'étude	202
a)	Choix des tests comportementaux	202
b)	Délai post-injection	203
c)	Effet de la surexpression chronique de l' α -syn	203
2.	Relation entre présence de la pathologie α -syn et dysfonctionnement cognitif	204
a)	Les données de la littérature chez l'Homme	204
b)	Les données de la littérature chez la souris	205
IX.	Discussion finale	207
A.	Différences structurales	210
1.	Expression diffuse de l' α -syn dans le cerveau	211
2.	Expression ciblée de l' α -syn dans le tronc cérébral.....	212
a)	Substance noire et striatum	212
b)	Système entérique et noyau moteur dorsal du nerf vague.....	213
3.	Expression ciblée de l' α -syn dans les BO	214
4.	Expression ciblée de l' α -syn dans l'insula	215
B.	Différences moléculaires des fibrilles pathologiques	216

X. Conclusion & perspectives	221
XI. Figures supplémentaires	227
XII. Annexes	245
XIII. Bibliographie	255

Liste des figures et tableaux

Introduction

Figure 1. Chevauchement des caractéristiques cliniques dans le spectre des altérations cognitives majeures avec corps de Lewy.	7
Figure 2. Scores de sévérité de la pathologie Lewy.	14
Figure 3. L'insula et ses connexions chez l'Homme.	15
Figure 4. Le cortex insulaire et ses connexions chez le rongeur.	17
Figure 5. L' α -syn comme cible thérapeutique.	20
Figure 6. Structure de l' α -syn et conformations membranaire et cytosolique.	25
Figure 7. Propriétés fonctionnelles de l' α -syn à la synapse.	30
Figure 8. Immunohistochimies montrant des CL dans différentes synucléinopathies.	37
Figure 9. L'agrégation de l' α -syn est caractérisée par une réaction de polymérisation dépendante d'une phase de nucléation.	39
Figure 10. Structure en feuillets β croisés des fibrilles d' α -syn.	41
Figure 11. Voies impliquées dans la toxicité de l' α -syn.	44
Figure 12. Mécanismes hypothétiques de la propagation type prion des protéines dans les maladies neurodégénératives.	45
Figure 13. Voies de propagation intercellulaire de l' α -syn.	47
Figure 14. Modèle d'Atkinson et Shiffrin (1971).	58
Figure 15. La mémoire déclarative vs non-déclarative.	61
Figure 16. Le décours temporel d'un engramme.	62
Figure 17. Le modèle standard de consolidation.	65
Figure 18. Comparaison du modèle standard de la consolidation et de la théorie de la trace multiple.	67

Matériel & méthodes

Figure 19. Les sutures crâniennes, le bregma et le lambda.	78
Figure 20. L'appareil stéréotaxique.	79
Figure 21. Injection dans le cortex insulaire antérieur d'une souris.	81
Figure 22. Dispositif du labyrinthe en croix surélevé.	85
Figure 23. Dispositif de l'actographie.	86
Figure 24. Piscine de Morris.	89
Figure 25. Objets utilisés lors des tests de mémoires de reconnaissances d'objets.	91
Figure 26. Dispositif et protocoles de mémoires de reconnaissances d'objets.	94
Figure 27. Attribution des scores de nesting.	96
Figure 28. Protocole du test d'apprentissage d'un nouveau goût.	98
Figure 29. Protocole du test de franchissement de la barre.	100
Figure 30. Transparisation d'un cerveau par la méthode iDISCO.	106

Résultats – Partie I

Figure 31. L' α -synucléine humaine est majoritairement exprimée dans l'hippocampe dorsal des souris SNCA âgées de 14 mois.	114
--	-----

Figure 32. L'expression de l' α -syn pS129 est augmentée dans le CF et l'HD des souris SNCA comparé aux souris WT.	117
Figure 33. Les souris SNCA âgées de 12-14 mois n'ont pas de déficits majeurs dans les tâches spatiales hippocampo-dépendantes.	120
Figure 34. La mémoire de reconnaissance d'objets est partiellement affectée chez les souris SNCA âgées de 12-14 mois.	123
Figure 35. Plusieurs protéines synaptiques ainsi que le marqueur astrocytaire GFAP sont réduits dans le CF des souris SNCA âgées de 14 mois.	128
Figure 36. Les patients au stade prodromal de la MCL (pro-MCL) présentent des déficits cognitifs.	132

Discussion – Partie I

Figure 37. Marquages histopathologiques α -syn caractéristiques de la MCL et de la MP. ..	138
Figure 38. Maturation d'inclusions somatiques d' α -syn pS129.	139

Résultats – Partie II

Figure 39. L'injection de fibrilles d' α -syn humaine non mutée dans le striatum dorsal induit une pathologie de l' α -syn dès 55 jours p.i.	156
Figure 40. Coupes frontales d'un cerveau de souris injecté avec des monomères ATTO488.	158
Figure 41. L'injection de fibrilles d' α -syn humaine non mutée dans le CI ant induit une pathologie α -syn à proximité du site d'injection chez les souris WT et SNCA 4 mois p.i.	160
Figure 42. Les souris SNCA FIB ne présentent pas de différence du niveau d'anxiété basale comparé aux souris WT PBS et SNCA PBS, dans le test du labyrinthe en croix surélevé.	163
Figure 43. L'apprentissage et la mémoire spatiale de référence en piscine de Morris sont préservés chez les souris SNCA FIB âgées de 12-14 mois.	165
Figure 44. La mémoire de RNO, mais pas celle d'OiP, est préservée chez les souris SNCA FIB âgées de 12-14 mois.	168
Figure 45. Test du nouveau goût chez les souris SNCA FIB âgées de 12-14 mois.	170
Figure 46. Pesée des selles chez les souris SNCA FIB âgées de 12-14 mois.	171
Figure 47. Le nesting n'est pas affecté chez les souris SNCA FIB à 12-14 mois.	171
Figure 48. Les souris SNCA FIB ont une activité locomotrice nocturne réduite par rapport aux souris WT PBS à 12-14 mois.	173
Figure 49. Les souris SNCA FIB ne présentent pas de déficits de coordinations motrices dans le test de la barre à 12-14 mois.	173
Figure 50. Cartographie de la pathologie α -syn de type neurite 9 mois p.i. bilatérale de fibrilles d' α -syn humaine dans le CI ant.	176
Figure 51. Propagation de la pathologie α -syn pS129 à partir du striatum dorsal dans des structures anatomiquement connectées dans le cerveau de souris WT.	179
Figure 52. Pathologie α -syn pS129 4 mois p.i. de fibrilles d' α -syn dans le striatum dorsal.	181

Figure 53. Comarquage α -syn pS129/GFAP 4 mois p.i. de fibrilles d' $h\alpha$ -syn dans le striatum dorsal.....	182
Figure 54. Propagation de la pathologie α -syn pS129 au sein du cortex insulaire 4 mois p.i. de fibrilles d' $h\alpha$ -syn de manière unilatérale dans le CI ant de souris WT.	184
Figure 55. Pathologie α -syn pS129 7 et 12 mois p.i. de fibrilles d' $h\alpha$ -syn dans le CI ant.	186
Figure 56. Pathologie α -syn pS129 7 mois p.i. unilatérale de fibrilles d' $h\alpha$ -syn dans le CI ant de souris WT.....	187
Figure 57. Pathologie α -syn pS129 12 mois p.i. unilatérale de fibrilles d' $h\alpha$ -syn dans le CI ant de souris WT.....	190

Discussion finale

Figure 58. Progression de la pathologie Lewy dans la MP selon les 6 stades de Braak.	209
Figure 59. Représentation dans un cerveau de souris des structures affectées chez l'Homme dans les différents types de pathologie Lewy, et structures essentiellement affectées dans la MP.	211
Figure 60. Résultats majeurs de l'injection de fibrilles d' α -syn dans les couches musculaires du pylore et du duodénum innervés par le nerf vague.....	214
Figure 61. Présentation du dispositif utilisé dans l'étude de transmission et de propagation de différentes souches pathologiques d' α -syn.	218

Tableaux

Tableau 1. Critères diagnostics de la maladie à corps de Lewy.	8
Tableau 2. Evaluation de la probabilité que la neuropathologie détectée soit associée à un syndrome clinique de MCL.	14
Tableau 3. Mutations autosomales dominantes liées aux synucléinopathies.....	34
Tableau 4. Sites de phosphorylation de l' α -syn.	36
Tableau 5. Modèles transgéniques exprimant l' α -syn modélisant une pathologie type MCL.	51
Tableau 6. Modèles murins de synucléinopathies basés sur la propagation de l' α -syn.....	53
Tableau 7. Méthodes d'anesthésies utilisées pour les chirurgies stéréotaxiques.....	80
Tableau 8. Caractéristiques des protocoles expérimentaux de chaque test de mémoire de reconnaissance d'objet.	93
Tableau 9. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les Western blots.	103
Tableau 10. Estimation des structures affectées par la pathologie α -syn pS129 7 mois p.i. unilatérale de fibrilles d' $h\alpha$ -syn non mutée dans le CI ant de souris WT.....	188
Tableau 11. Estimation des structures affectées par la pathologie α -syn pS129 12 mois p.i. unilatérale de fibrilles d' $h\alpha$ -syn non mutée dans le CI ant de souris WT.....	191

Figures supplémentaires

Figure S1. Western blots et protéines totales pour l' $h\alpha$ -syn et l'actine	229
Figure S2. Western blots et protéines totales pour la quantification des taux d' α -syn pS129 et totale.....	230
Figure S3. Immunohistochimie α -syn pS129 réalisée sur des coupes frontales de cerveau de souris WT et SNCA âgées de 14 mois.....	231

Figure S4. La mémoire spatiale en piscine de Morris et dans la tâche de localisation d'objets chez des souris SNCA âgées de 12-14 mois.	232
Figure S5. Vérifications de divers paramètres pour la réalisation des tests objets.	234
Figure S6. Les souris SNCA âgées de 12-14 mois ne présentent pas de déficit olfactif dans une tâche d'enfouissement de nourriture.	237
Figure S7. Les souris SNCA ne diffèrent pas des souris WT dans la tâche du nouveau goût à 12-14 mois.	237
Figure S8. La capacité de faire son nid n'est pas affectée chez les souris SNCA à 12-14 mois.	238
Figure S9. Les souris SNCA ont une activité locomotrice identique à celles des souris WT à 12-14 mois.	238
Figure S10. Les souris SNCA ne présentent pas de déficits de coordinations motrices dans le test de la barre à l'âge de 18 mois.	239
Figure S11.1. Western blots et membranes présentant les protéines totales pour quantification de la synaptophysine, la neurogranine, PSD95, Rab10, NeuN et GFAP dans le CF des souris WT et SNCA âgées de 14 mois.	240
Figure S11.2. Taux protéiques des marqueurs synaptiques, axonal, nucléaire et astrocytaire dans l'HD des souris WT et SNCA âgées de 14 mois.	241
Figure S11.3. Taux protéiques de marqueurs synaptiques, axonal, nucléaire et astrocytaire dans le Str des souris WT et SNCA âgées de 14 mois.	242
Figure S12. Analyses complémentaires des tests neuropsychologiques.	243

Annexes

Annexe 1. Manipulations réalisées sur le modèle SNCA.	247
Annexe 2. Injections unilatérales de fibrilles d'h α -syn dans le cortex insulaire antérieur de souris WT.	248
Annexe 3. Manipulations réalisées sur le modèle SNCA FIB.	249
Annexe 4. Injections unilatérales de fibrilles dans le striatum dorsal.	250
Annexe 5. Communications scientifiques.	251

Liste des abréviations

α-syn	α -synucléine
α-syn pS129	α -synucléine phosphorylée sur la sérine 129
AA	acides aminés
AI	« anterior insula », insula antérieure
Ac	anticorps
AcbC	cœur du noyau accumbens
AcbS	coquille du noyau accumbens
ACM	altération cognitive majeure
AID	cortex insulaire agranulaire dorsal
AIP	cortex insulaire agranulaire postérieur
AIV	cortex insulaire agranulaire ventral
AMS	atrophie multisystématisée
Amy	amygdale
AOL	région olfactive antérieure, partie latérale
AOM	région olfactive antérieure, partie médiale
AOP	région olfactive antérieure, partie postérieure
AOV	région olfactive antérieure, partie ventrale
AP	antéropostérieur
APOE4	allèle ϵ 4 du gène de l'apolipoprotéine E
β-syn	β -synucléine
BLA	noyau amygdalien basolatéral
BO	bulbes olfactifs
CA1	corne d'Ammon 1
CA2	corne d'Ammon 2
CA3	corne d'Ammon 3
CeA	noyau amygdalien central
CEnt	Cx entorhinal caudomédial
CF	cortex frontal
Cg	cortex cingulaire
Cg1	cortex cingulaire primaire
Cg2	cortex cingulaire secondaire
CI	cortex insulaire
CI ant	cortex insulaire antérieur
Cl	claustrum
CL	corps de Lewy
CM	noyau thalamique central
Contro	controlatéral
CPF	cortex préfrontal
CPFm	cortex préfrontal médian
CPu	caudé putamen
Ct	« C-terminal », terminaison C
Cx	cortex
DA	dopamine
DAT	transporteur dopamine

DEn	claustrum endopiriforme dorsal
DI	cortex insulaire dysgranulaire
DLB	«dementia with Lewy bodies », démence à corps de Lewy
DLEnt	cortex entorhinal dorsolatéral
DLO	cortex orbitofrontal dorsolatéral
DP	démence parkinsonienne
DTT	taenia tecta dorsal
DV	dorsoventral
Ect	cortex ectorhinal
Ent	cortex entorhinal
EntL	cortex entorhinal latéral
Fr3	cortex frontal associatif 3
FrA	cortex frontal associative
GBA	gène de la glucocérébrosidase
GCase	glucocérébrosidase
GD	gyrus denté
GFAP	« glial fibrillary acidic protein »
GI	cortex insulaire granulaire
GrO	couche cellulaire granulaire du bulbe olfactif
hα-syn	α -synucléine humaine non mutée
HD	hippocampe dorsal
HV	hippocampe ventral
IEn	claustrum endopiriforme intermédiaire
IL	cortex infralimbique
IMD	noyau thalamique intermédiodorsal
Ipsi	ipsilatéral
KO	« knock-out »
La	noyau amygdalien latéral
LaDL	noyau amygdalien dorsolatéral
LBD	« Lewy bodies dementia »
LO	cortex orbitofrontal latéral
LO	localisation d'objet
M1	cortex moteur primaire
M2	cortex moteur secondaire
MA	maladie d'Alzheimer
MCL	maladie à corps de Lewy
MEnt	cortex entorhinal médial
ML	médiolatéral
MMSE	mini mental state examination
MO	cortex orbitofrontal médial
mOT	mémoire de l'ordre temporel
MP	maladie de Parkinson
MPT	modifications post-traductionnelles
mThy-1	« mouse thymus cell antigen 1», antigène 1 de cellule thymique murin
NAC	«Non-A β Component »
NACP	NAC précurseur
NDG	neurodégénérescence

NE	nord-est (quadrant)
NeuN	« neuronal nucleus »
NL	neurites de Lewy
NO	nord-ouest (quadrant)
Nrgn	neurogranine
Nt	« N-terminal », terminaison N
OiP	« object-in-place »
PAF	paraformaldéhyde
PBS	« phosphate-buffered saline », tampon phosphate salin
p.i.	post-injection
Pir	cortex piriforme
PLT	potentialisation à long terme
PRh	cortex périrhinal
PrL	cortex prélimbique
PSD95	« post synaptic density 95 »
Rab10	« Ras-related protein 10 »
RI	rappel indicé
RL	rappel libre
RNO	reconnaissance de nouvel objet
RT	rappel total
S1	cortex somatosensoriel primaire
S2	cortex somatosensoriel secondaire
SE	sud-est (quadrant)
Ser	sérine
SN	substance noire
SNARE	« soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors »
SNc	substance noire compacte
SNCA	« synuclein alpha », gène de l' α -synucléine
SNCB	« synuclein beta », gène de la β -synucléine
SNr	substance noire réticulée
SO	sud-ouest (quadrant)
Str	striatum
Syp I	synaptophysine I
TC	tronc cérébral
TeA	cortex associatif temporal
TH	tyrosine hydroxylase
Thal	thalamus
Thy-1	« thymus cell antigen 1 », antigène 1 de cellule thymique
Tyr	tyrosine
VEn	claustrum endopiriforme ventral
VO	cortex orbitofrontal ventral
VTA	aire tegmentale ventrale
WT	«wild-type », type sauvage

Avant-propos

La maladie à corps de Lewy (MCL) est la deuxième maladie cognitive neurodégénérative la plus commune après la maladie d'Alzheimer (MA) (Heidebrink, 2002 ; Geser et al., 2005 ; Zupancic et al., 2011), ce qui en fait un enjeu de santé publique majeur. Il existe un chevauchement des caractéristiques cliniques de la MCL, de la MA et de la maladie de Parkinson (MP). En effet, les patients atteints de MCL présentent des déficits cognitifs similaires à ceux atteints de MA en début de pathologie, ainsi qu'une ou plusieurs caractéristiques du syndrome parkinsonien. De ce fait, la MCL est souvent confondue avec la MA en début de pathologie. C'est une des raisons pour laquelle la MCL n'a été décrite pour la première fois qu'en 1996, et qu'elle est à ce jour toujours sous diagnostiquée (McKeith et al., 1996). Le critère central du diagnostic clinique est l'altération cognitive majeure (ACM), aussi appelée démence, à laquelle s'ajoutent des caractéristiques essentielles : fluctuations cognitives et attentionnelles, hallucinations visuelles récurrentes, altération du sommeil paradoxal et au moins une des caractéristiques du syndrome parkinsonien (McKeith et al., 2017).

La marque neuropathologique de la MCL est la présence de corps de Lewy (CL) et de neurites de Lewy (NL) qui sont des inclusions intraneuronales cytoplasmiques (ou gliales) dont le constituant majeur est l' α -synucléine (α -syn). Cette caractéristique place la MCL dans la famille des synucléinopathies qui comprend également la MP, la démence parkinsonienne (DP), et l'atrophie multisystématisée (AMS), qui présente quant à elle des CL dans les oligodendrocytes. Des mutations ou surexpressions (duplication ou triplication) du gène SNCA de l' α -syn ont été identifiées dans des formes familiales de MP (Polymeropoulos et al., 1997 ; Krüger et al., 1998 ; Singleton et al., 2003 ; Chartier-Harlin et al., 2004a ; Farrer et al., 2004 ; Ibáñez et al., 2004 ; Zarranz et al., 2004). Dès lors, de nombreux modèles animaux exprimant ou surexprimant l' α -syn, mutée ou non, et sous divers promoteurs, ont été développés afin de modéliser la MP. Des modèles de surexpression de l' α -syn ont été caractérisés afin de mettre en évidence des atteintes motrices, car ces modèles ont initialement été développés pour la MP (Magen et Chesselet, 2010 ; Crabtree et Zhang, 2012). De ce fait, dans un premier temps peu d'attention a été portée aux troubles cognitifs présentés par ces modèles, puis des déficits cognitifs ont pu être révélés (Hatami et Chesselet, 2015), mais à l'heure actuelle, il n'existe que peu de modèles établis de MCL.

Il est donc important de caractériser de nouveaux modèles animaux pour la MCL, de sorte à améliorer notre compréhension de la pathologie, mais aussi de pouvoir développer des biomarqueurs précoces qui pourraient faciliter le diagnostic de cette pathologie, ainsi que d'envisager des approches thérapeutiques.

Dans un premier temps, j'ai caractérisé un modèle murin de surexpression de l' α -syn humaine (h α -syn) sous le promoteur murin Thy-1, qui n'avait jamais été décrit auparavant (mThy1-hSNCA, lignée 12, Jackson Laboratory). Nous avons choisi de caractériser ce modèle qui est, à partir de maintenant, appelé modèle SNCA, car il est décrit par Jackson Laboratory que la surexpression du transgène se fait particulièrement dans le cortex (Cx) et l'hippocampe dorsal (HD). Nous avons confirmé un taux d'expression très élevé de la protéine h α -syn dans l'HD, et un taux élevé dans le CF. L'expression élevée du transgène dans ces régions cérébrales impliquées dans les fonctions cognitives, et plus spécifiquement la mémoire, a rendu ce modèle particulièrement attractif pour modéliser une synucléinopathie cognitive, et donc éventuellement une MCL. En effet, les modèles générés pour la MP ciblent préférentiellement le tronc cérébral (TC), la substance noire (SN), ou le striatum (Str). Ceci expliquerait que ce modèle généré par la fondation Michael J. Fox pour la recherche sur la MP, n'a jamais été caractérisé auparavant.

Dans une seconde approche, nous avons suivi une stratégie se basant sur de récents travaux démontrant l'altération précoce du cortex insulaire antérieur (CI ant) dans la MCL (Blanc et al., 2014, 2015, 2016 ; Roquet et al., 2017). Nous avons donc réalisé des injections de fibrilles pathologiques d'h α -syn dans le CI ant du modèle SNCA afin d'y induire la pathologie, comme cela a déjà été fait dans d'autres structures (Luk et al., 2012b, 2012a ; Masuda-Suzukake et al., 2013 ; Sacino et al., 2013, 2014 ; Recasens et al., 2014 ; Bernis et al., 2015 ; Peelaerts et al., 2015 ; Hu et al., 2016 ; Rey et al., 2016, 2018). J'ai ensuite caractérisé ce modèle au même âge que le modèle SNCA.

L'introduction de ma thèse s'articule en trois chapitres. Dans un premier temps, j'introduis les connaissances actuelles majeures concernant les caractéristiques cliniques et neuropathologiques de la MCL. Le deuxième chapitre traite quant à lui du composant majeur des CL : l' α -syn. J'aborderai les concepts actuels sur sa pathogénicité, ainsi que certains des modèles générés pour son étude et pour la modélisation de la MCL. Enfin, le dernier chapitre de cette introduction décrit les différents systèmes de mémoire chez l'Homme, ainsi que les

étapes de la formation et du rappel d'un souvenir. Après avoir exposé les objectifs qui ont animé mon travail de thèse, et les méthodes utilisées pour y parvenir, je décris puis discute, dans une seconde partie, les résultats de la caractérisation du modèle SNCA. Je présente dans une troisième partie les résultats obtenus pour le deuxième axe de recherche, qui a notamment permis de déterminer les voies de transport de l' α -syn pathologique à partir du Cl ant, structure cérébrale qui n'avait jamais été étudiée dans ce cadre auparavant. Après une discussion globale sur l'origine des différences entre la MCL et la MP, je termine cette thèse par une conclusion succincte sur mon travail, et les perspectives à court terme et à long terme que suscitent mes résultats.

I. Introduction

A. La maladie à corps de Lewy

La **maladie à corps de Lewy** (MCL) est la deuxième maladie cognitive neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer (MA). Cependant c'est une pathologie qui est peu connue du grand public. Ceci n'est pas très étonnant lorsqu'on sait que la MCL n'a été décrite comme une pathologie à part entière qu'en 1996 lors du premier colloque international sur la MCL (McKeith et al., 1996). C'est lors de ce consortium que des critères cliniques ont été établis afin de différencier la MCL de la MA et de la maladie de Parkinson (MP), maladies avec lesquelles elle partage de nombreuses caractéristiques cliniques et anatomopathologiques.

La terminologie autour de la MCL peut prêter à confusion. En effet, de nombreux noms lui ont été donnés, ce qui souligne l'incertitude qui plane autour de la MCL afin de déterminer si elle représente un point sur un spectre de maladies à corps de Lewy, ou si elle constitue une pathologie distincte. Les noms qui lui ont été donnés au fil du temps sont les suivants : maladie à corps de Lewy diffus, maladie à corps de Lewy corticaux, variant à corps de Lewy de la maladie d'Alzheimer, démence sénile de type corps de Lewy, démence à corps de Lewy et enfin MCL. De plus, la terminologie française et anglaise n'est pas tout à fait la même puisqu'en France on parle de MCL, alors qu'en anglais « Lewy body diseases » englobe l'ensemble des pathologies caractérisées par la présence de corps de Lewy, à savoir les synucléinopathies. De ce fait, en anglais on parle de « dementia with Lewy bodies » (DLB) pour parler de la MCL – à ne pas confondre avec « Lewy bodies dementias » (LBD), cette dernière terminologie englobant la démence parkinsonienne (DP) et la MCL (DLB en anglais). La MCL fait donc partie de la famille des synucléinopathies avec la MP, la DP, et l'atrophie multisystématisée (AMS).

1. Epidémiologie

a) Les chiffres

La MCL est une pathologie très répandue dans la population vieillissante, certaines études suggérant même qu'elle serait la deuxième cause d'altération cognitive majeure (ACM) la plus commune, après la MA (Heidebrink, 2002 ; Geser et al., 2005 ; Zupancic et al., 2011 ; Mueller et al., 2017). Une méta-analyse de données épidémiologiques réalisée en avril 2012 a rapporté que la MCL représente en moyenne 7,5 % de tous les cas d'ACM diagnostiqués sur la base des

symptômes cliniques en établissement de soins secondaires, et 4,2 % de tous les cas d'ACM diagnostiqués en établissement de soins primaires. L'incidence moyenne était de 0,87 cas/1000 personnes, et 3,8 % de tous les nouveaux cas d'ACM diagnostiqués (Jones et O'Brien, 2014). La prévalence actuelle de cette pathologie reste à ce jour encore mal estimée. En effet, des prévalences différentes sont observées entre différentes zones géographiques mais aussi au sein d'une même région. Cela pourrait refléter de véritables différences de prévalence mais aussi une variabilité du diagnostic clinique lié à la difficulté d'établir ce dernier (Kane et al., 2018). Comme dans la plupart des pathologies neurodégénératives, le diagnostic final ne peut être apporté que par l'autopsie. Selon les différentes études d'autopsie publiées entre 1992 et 2010, la prévalence de la MCL varie de 1,1 à 24,7 % (Jellinger et Attems, 2011).

De plus, selon une étude menée à Olmsted County dans le Minnesota (EU), par Savica et collègues de janvier 1991 à décembre 2005 (15 ans), l'incidence de la MCL est plus élevée chez les hommes que chez les femmes (4,8 vs 2,2). Ces résultats ont également été observés dans d'autres études (Perez et al., 2010 ; Kane et al., 2018). Les différences d'incidence observées entre hommes et femmes suggèrent des causes de la pathologie pouvant être liées au sexe, aussi bien aux niveaux génétique et endocrinien qu'aux niveaux sociétal, environnemental, et culturel (Savica et al., 2013).

b) Etiologie et facteurs de risque

Les causes de la MCL ne sont pas bien connues comme c'est le cas pour de nombreuses pathologies neurodégénératives. Bien que la plupart des cas soient considérés comme sporadiques, on peut constater la présence d'ACM ou de MP dans les histoires familiales de patients atteints de MCL, suggérant une implication des facteurs génétiques dans l'étiologie de la pathologie au moins aussi importante que dans la MA ou la MP (Vergouw et al., 2019). Cependant peu de familles présentant plusieurs cas de MCL ont été identifiées (Tsuang et al., 2004 ; Vergouw et al., 2017). Ceci n'est pas étonnant puisque la MCL est à ce jour encore sous diagnostiquée. Il est donc probable que des formes familiales n'aient pas été identifiées. Les connaissances des causes génétiques de la MCL demeurent par conséquent limitées à ce jour.

Comme décrit dans la partie « Mutations, surexpressions et modifications post-traductionnelles » (p.33), le gène SNCA de l' α -syn est impliqué dans l'étiologie génétique de la MP. En effet, des mutations faux sens ainsi que des cas de multiplication du gène SNCA ont été identifiés dans des formes autosomales dominantes de la MP. Les cas de familles

présentant des mutations ou une triplication du gène SNCA de l' α -syn développent une forme précoce de MP et non de MCL (Singleton et al., 2003 ; Zarranz et al., 2004 ; Yamaguchi et al., 2005). La duplication du gène SNCA quant à elle entraîne une pathologie α -syn corticale qui correspond davantage à ce qu'on observe dans la MCL, mais l'ACM n'apparaît qu'à un stade tardif de la pathologie, après les symptômes moteurs (Outeiro et al., 2019). Ceci correspondrait donc davantage à une DP (voir « Symptômes de la MCL » p.6).

Bien que les événements moléculaires menant au développement de la MCL soient toujours inconnus, plusieurs auteurs ont identifié des réseaux de gènes qui sont dérégulés au niveau épigénétique, et notamment par la méthylation de l'ADN (Delgado-Morales et Esteller, 2017). La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique associée à la répression des gènes (Deaton et Bird, 2011) qui peut entraîner des troubles des fonctions cognitives et notamment mnésiques (Fischer, 2014). Par exemple, Humphries et collaborateurs ont démontré que les tissus cérébraux des patients atteints de MCL présentent une méthylation de l'ADN de gènes reliés à la fonction synaptique et aux réponses comportementales (Humphries et al., 2015). Ceci est en accord avec le développement de l'ACM chez les patients. Desplats et collègues ont quant à eux décrit une hypométhylation globale dans les cerveaux de patients MCL autopsiés, qui serait liée à la séquestration en dehors du noyau de l'enzyme permettant la méthylation, la Dnmt1, par l' α -syn (Desplats et al., 2011).

L'âge est le facteur de risque majeur de la MCL, et le sexe le serait également avec plus d'hommes atteints par la maladie que de femmes (Savica et al., 2013). Au niveau des gènes décrits comme facteurs de risque, on retrouve l'allèle ϵ 4 de l'apolipoprotéine E (APOE4) comme dans la MA (Tsuang et al., 2013 ; Geiger et al., 2016 ; Keogh et al., 2016), et les mutations du gène GBA codant pour l'enzyme lysosomale glucocérébrosidase (GCCase) comme dans la MP (Nalls et al., 2013 ; Bras et al., 2014 ; Guerreiro et al., 2018, 2019). L'implication du gène SNCA a été décrite ci-dessus dans des cas familiaux de synucléinopathies, mais de récentes études ont montré l'implication du gène SNCA dans des formes sporadiques de la MCL (Bras et al., 2014 ; Guerreiro et al., 2018). De plus, la dépression, l'anxiété, et la faible consommation de caféine sont également considérés comme des facteurs de risque (Boot et al., 2013).

2. Symptômes de la MCL

a) Chevauchement des caractéristiques cliniques

La MCL est une pathologie difficile à diagnostiquer, notamment en raison du chevauchement des critères cliniques qui la caractérisent avec les caractéristiques de la MP et la DP, et ceux de la MA (**Figure 1A**) (Delenclos et al., 2017). Ce qui permet de distinguer la DP de la MCL est le décours temporel de l'apparition des symptômes moteurs et cognitifs : dans la MCL les troubles moteurs arrivent après les troubles cognitifs (ou sont absents) (**Figure 1B**), et dans la DP l'ACM apparaît dans le cadre d'une MP établie, dans laquelle les troubles cognitifs apparaissent au moins 1 an après l'apparition du syndrome parkinsonien (**Figure 1C**) (McKeith et al., 1996, 2017). Si la distinction ne peut être faite entre la MCL et la DP, la pathologie devra être appelée par un terme générique tel que « altération cognitive majeure avec corps de Lewy » (« Lewy body dementia ») (**Figure 1A**).

b) Critères diagnostics

Les critères diagnostics établis la première fois en 1996 par McKeith et collègues ont été revus et modifiés lors des trois colloques internationaux suivants, permettant ainsi d'améliorer la sensibilité du diagnostic (McKeith et al., 1996, 1999, 2005, 2017).

Le critère **essentiel** de la MCL est l'apparition d'une ACM, celle-ci se caractérisant par un déclin cognitif d'ampleur assez importante pour interférer avec les activités instrumentales de la vie quotidienne, et donc compromettre l'indépendance du patient. Les caractéristiques cliniques sont classées et définies comme centrales ou favorables, et les biomarqueurs comme indicatifs ou favorables (**Tableau 1**).

Pour qu'un diagnostic de **MCL probable** soit effectué, il faut que le patient présente au moins deux caractéristiques centrales avec ou sans présence de biomarqueurs indicatifs, ou bien une seule caractéristique centrale avec au moins un biomarqueur indicatif. Afin qu'un patient soit diagnostiqué avec une **MCL possible**, il suffit d'une caractéristique centrale, ou bien au moins un biomarqueur indicatif en l'absence de caractéristique centrale.

L'ACM peut être diagnostiquée avec des outils tels que le « Mini Mental State Examination » (MMSE), mais il est nécessaire que les cliniciens utilisent d'autres tests neuropsychologiques afin d'évaluer des fonctions cognitives plus spécifiques. En effet, les patients MCL présentent des troubles de l'attention, des fonctions exécutives, et de

perception visuelle et spatiale plutôt précoces. En revanche, la mémoire semble relativement préservée en début de maladie alors que c'est un des premiers symptômes de la MA. De même, la récupération des mots est affectée de manière précoce dans la MA, ainsi que la mémoire à court et moyen terme et la reconnaissance, ce qui n'est pas le cas dans la MCL. Le MMSE seul ne permet pas de différencier la MCL d'autres altérations cognitives majeures. Des patients MCL pourraient même avoir un score normal au MMSE (McKeith et al., 2005).

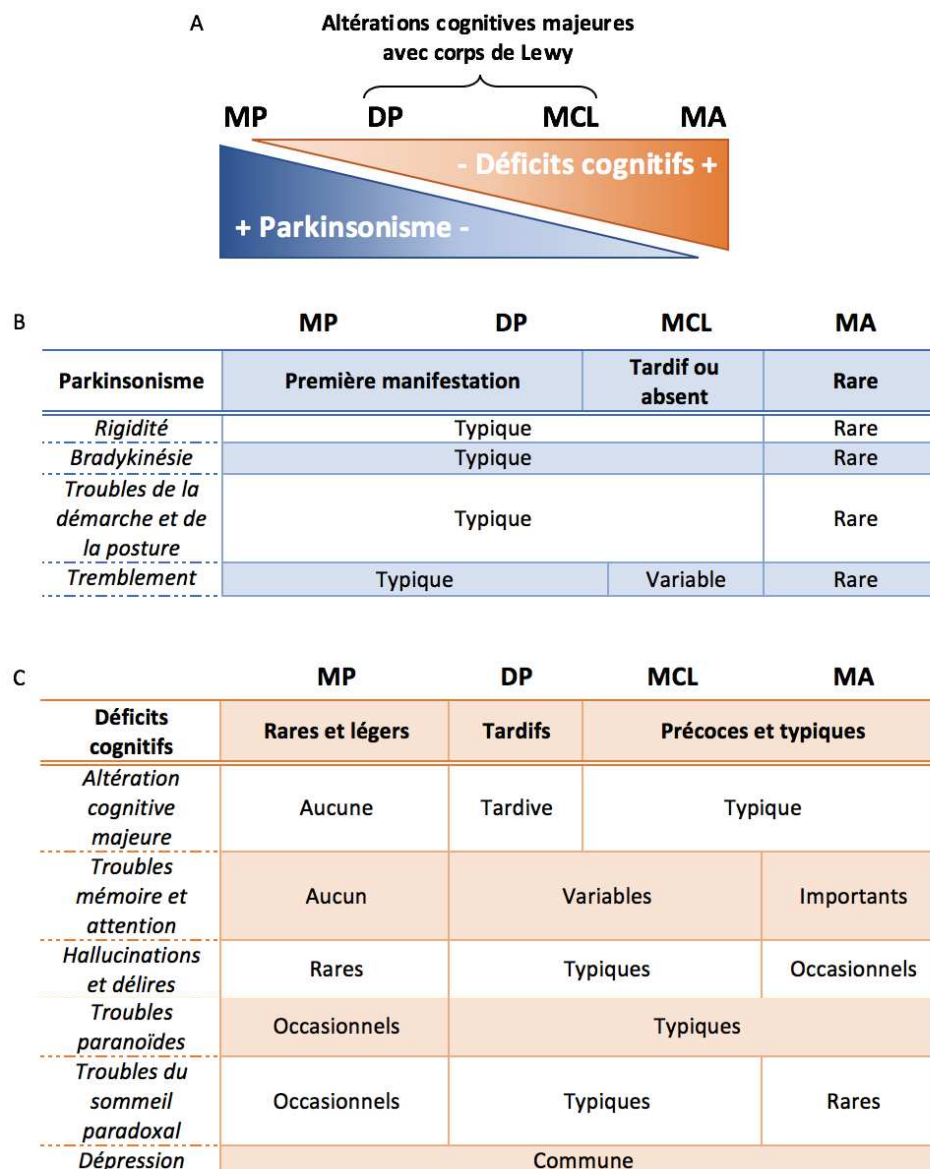


Figure 1. Chevauchement des caractéristiques cliniques dans le spectre des altérations cognitives majeures avec corps de Lewy. (A) Schéma représentant le chevauchement des caractéristiques cliniques. (B) Manifestation du parkinsonisme au sein de la MP, la DP, la MCL et la MA. (C) Manifestation des déficits cognitifs au sein de la MP, la DP, la MCL et la MA. *MCL*, maladie à corps de Lewy ; *DP*, démence parkinsonienne ; *MA*, maladie d'Alzheimer ; *MP*, maladie de Parkinson. D'après Delenclos, 2017.

Caractéristiques cliniques	
Centrales	Favorables
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fluctuations cognitives avec variations importantes de l'attention et de la vigilance ➤ Hallucinations visuelles récurrentes habituellement bien formées et détaillées ➤ Trouble du comportement en sommeil paradoxal pouvant apparaître avant le déclin cognitif ➤ Une ou plusieurs caractéristiques du syndrome parkinsonien : bradykinésie, tremblement de repos, rigidité 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sensibilité sévère aux antipsychotiques ➤ Instabilité posturale ➤ Chutes répétées ➤ Syncopes ou absences transitoires de réactions transitoires ➤ Troubles végétatifs sévères : constipation, hypotension orthostatique, incontinence urinaire ➤ Hallucinations dans d'autres modalités sensorielles ➤ Délire systématisé : délire où les idées délirantes sont organisées, donnant l'impression d'une cohérence ➤ Apathie, anxiété, dépression
Biomarqueurs	
Indicatifs	Favorables
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Réduction de la capture de dopamine par les transporteurs au niveau des noyaux gris centraux, démontrée par TEMP ou TEP ➤ Scintigraphie cardiaque à la 123I-MIBG anormale : fixation cardiaque de la MIBG diminuée ➤ Confirmation de sommeil paradoxal sans atonie des membres par polysomnographie 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ IRM, TDM : préservation relative des structures du lobe temporal médian (<i>à l'inverse des patients atteints de MA</i>) ➤ TEMP, TEP : fixation basse du traceur de manière générale, avec réduction de l'activité occipitale +/- signe de l'îlot cingulaire (TEP au FDG) ➤ EEG : activité à ondes lentes prééminente dans les régions postérieures avec fluctuations périodiques dans la bande pré-α/θ

Tableau 1. Critères diagnostiques de la maladie à corps de Lewy. EEG, électroencéphalographie ; FDG, fluorodéoxyglucose ; IRM, imagerie par résonance magnétique ; TDM : tomodynamométrie ; TEMP, tomographie par émission monophotonique (« SPECT » en anglais) ; TEP, tomographie par émission de positons (« PET » en anglais) ; 123I-MIBG, 123 iode-métaiodobenzylguanidine. D'après McKeith et al., 2017.

(1) Fluctuations cognitives

Les **fluctuations cognitives** se caractérisent par des épisodes de comportements confus, de discours incohérents, d'attention variable, et d'états de conscience altérés, pendant lesquels le patient semble ailleurs ou regarde dans le vide, et par un excès de somnolences diurnes (McKeith et al., 2017). Cette caractéristique est la plus compliquée à détecter lors du diagnostic d'un patient (McKeith et al., 2005). Elle est souvent évaluée en interrogeant les proches du patient sur son état de confusion. Pour cela il est nécessaire d'utiliser un questionnaire détaillé et de réaliser une analyse précise des informations récoltées. Plusieurs échelles ont été établies, demandant plus ou moins d'expertise de la part du clinicien ou du chercheur : « Clinician Assessment of Fluctuation Scale » et « One Day Fluctuation Assessment Scale » (Walker et al., 2000), « Mayo Fluctuations Composite Scale » (Ferman et al., 2004), « Dementia Cognitive Fluctuation Scale » (Lee et al., 2014). Les variations attentionnelles peuvent être mesurées grâce à des tests informatisés. Il est recommandé qu'au moins une mesure formelle soit utilisée pour établir cette caractéristique lors du diagnostic de MCL (McKeith et al., 2005). De plus elle permet de distinguer les patients MCL des patients MA avec une bonne sensibilité en début de pathologie. En effet, les fluctuations cognitives peuvent apparaître dans des stades tardifs d'autres ACM, il est donc important de les diagnostiquer au stade précoce de la MCL (McKeith et al., 2017). De plus les fluctuations de l'attention et de la vigilance peuvent laisser penser que le patient souffre de troubles mnésiques.

(2) Hallucinations visuelles

Les **hallucinations visuelles récurrentes** sont également une caractéristique présente de manière précoce chez les patients. Près de 80 % des patients MCL sont sujets à ces hallucinations. Les patients dont les troubles cognitifs sont légers à modérés sont capables de rapporter ces hallucinations et de les décrire. Elles représentent souvent des personnes, des enfants ou des animaux. Ces patients présentent davantage de troubles visuo-perceptifs que ceux qui ne présentent pas d'hallucinations (McKeith et al., 2005, 2017). Les patients atteints de MA peuvent également présenter des hallucinations visuelles mais dans des stades plus tardifs (**Figure 1**).

(3) Troubles du comportement en sommeil paradoxal

Les **troubles du comportement en sommeil paradoxal** (« rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder » (RBD)) se manifestent par des rêves agités et souvent effrayants sans atonie musculaire. De ce fait le patient réalise les mouvements, parfois violents, qu'il est en train de rêver, et peut même parler ou crier. La personne qui partage le lit du patient peut témoigner de ces parasomnies, et celles-ci peuvent apparaître des années avant l'ACM ou le parkinsonisme. En effet ce trouble est commun aux synucléinopathies, mais pas trop aux autres pathologies neurodégénératives. Ces parasomnies peuvent d'ailleurs influencer les somnolences diurnes qui apparaissent lors des fluctuations (McKeith et al., 2005, 2017).

(4) Syndrome parkinsonien

Le **syndrome parkinsonien** spontané, c'est à dire non lié à la médication, est commun chez les patients MCL puisqu'il survient dans plus de 85 % des cas (McKeith et al., 2017). Les patients ne présentent pas obligatoirement tous les symptômes. En effet, un seul des symptômes de la triade parkinsonienne suffit comme caractéristique centrale pour le diagnostic clinique, sachant que le tremblement de repos n'est que rarement présent (McKeith et al., 2005). La sous-échelle à 5 items de l'« Unified Parkinson's Disease Rating Scale » (UPDRS) est utilisée plus spécifiquement dans les cas de diagnostic de la MCL, car elle ne présente que les 5 items qui peuvent être attribués sans que n'interfère l'état d'ACM du patient (tremblement de repos, tremblement d'action, bradykinésie, expression faciale et rigidité) (Ballard et al., 1997).

La MCL est diagnostiquée uniquement si l'ACM apparaît avant le syndrome parkinsonien ou de manière concomitante. Si un patient présente une des caractéristiques du syndrome un an avant l'apparition de l'ACM et des hallucinations visuelles, il doit alors recevoir un diagnostic de DP (Aarsland et al., 2001). Bien que ce délai soit arbitraire, il est très utile en recherche clinique si on veut distinguer la MCL de la DP. Attention cependant le terme de DP doit être utilisé pour décrire une altération cognitive majeure qui survient dans le cadre d'une MP bien établie (McKeith et al., 2017).

c) Sensibilité et spécificité des critères diagnostics

Tous ces symptômes ne sont pas exclusifs à la MCL comme cela a été mentionné ci-dessus. Plus la pathologie évolue plus elle partagera de symptômes avec la MA, avec l'apparition de troubles mnésiques par exemple. Les principales pathologies dites confondantes pour le diagnostic sont la MA, la démence vasculaire, la DP, la paralysie supranucléaire progressive, l'AMS, et la dégénérescence corticobasale, ainsi que les cas de psychoses et de bipolarité pour les troubles psychiatriques (Bousiges et Blanc, 2019).

Une méta analyse réalisée par Rizzo et collaborateurs à partir d'études sélectionnées en octobre 2016 a montré que grâce aux premiers critères établis en 1996, et à leur révision en 2005, la sensibilité du diagnostic a augmenté, c'est à dire que davantage de patients MCL sont diagnostiqués, mais que sa spécificité a un peu diminué (Rizzo et al., 2018). Globalement la justesse du diagnostic a tout de même augmenté. De futures études seront nécessaires pour investiguer si la mise à jour des critères de 2017 améliore encore davantage la sensibilité, mais surtout la spécificité du diagnostic.

Comme dans la plupart des maladies neurodégénératives cognitives le diagnostic clinique n'est pas suffisant pour donner le diagnostic définitif. Celui-ci ne peut être donné qu'après autopsie.

3. Anatomopathologie

a) Les corps de Lewy et neurites de Lewy

La caractéristique neuropathologique majeure de la MCL est la présence de corps de Lewy (CL) et de neurites de Lewy (NL). Ce sont des inclusions intra cytoplasmiques principalement composées d' α -synucléine (α -syn). On trouve les CL principalement dans le soma des neurones, et les NL dans les axones et dendrites. Ces inclusions sont retrouvées dans l'ensemble des synucléinopathies, à savoir la MP, la DP, la MCL et l'AMS. Leur pattern de distribution est différent selon les pathologies. Dans la MP, ils sont principalement concentrés dans le tronc cérébral (TC) en début de pathologie, ou bien dans les bulbes olfactifs (BO), puis s'accumulent dans les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (SNC) lorsque la pathologie progresse (Braak et al., 2003b). Dans la MCL, dès les stades précoces de la pathologie on observe une présence plus diffuse des CL, notamment dans les régions

limbiques et néocorticales (Marui et al., 2002 ; McKeith et al., 2017). A à un stade avancé de la MP, la pathologie Lewy peut également atteindre certaines régions du néocortex (Stade V de Braak), et même l'ensemble du néocortex (Stade VI de Braak). Chez des patients atteints de DP, comme l'ACM survient dans le cadre d'une MP établie et bien avancée, les CL sont également retrouvés dans le TC, le néocortex ainsi que dans les structures limbiques (Jellinger, 2018). Dans l'AMS, les CL sont localisés dans les oligodendrocytes, et de ce fait les NL ne constituent pas une caractéristique neuropathologique de cette maladie (Brettschneider et al., 2017).

Les CL sont également trouvés dans le système nerveux périphérique et autonome, ce qui pourrait être lié aux troubles végétatifs observés chez les patients, tels que l'hypotension orthostatique. Certains pensent en effet qu'il y a une corrélation entre la localisation des CL, leur densité, et les troubles neurologiques observés. C'est pourquoi les CL localisés dans le tronc cérébral seraient associés au syndrome parkinsonien, alors que les symptômes cognitifs et neuropsychiatriques seraient dus à leur présence dans le système nerveux limbique et le néocortex (Hurtig et al., 2000 ; Mattila et al., 2000 ; Aarsland et al., 2005 ; Molano et al., 2010 ; Zupancic et al., 2011). D'autres études montrent cependant que cette corrélation est fautive. Par exemple, la présence de CL corticaux ne serait pas nécessairement liée à l'ACM (Colosimo et al., 2003), et celle de CL dans la SN ne serait pas non plus liée à syndrome parkinsonien (Parkkinen et al., 2005). Cette dernière affirmation est soutenue quelques années plus tard par une étude montrant que les CL n'entraînent pas automatiquement de neurodégénérescence (NDG) des neurones dopaminergiques de la SN dans la MP (Iacono et al., 2015). La même année, une étude d'imagerie *in vivo* montre au contraire, pour la première fois, une NDG sélective des neurones présentant des CL (Osterberg et al., 2015).

b) Evaluation de la pathologie Lewy

Lors du premier rapport sur la MCL, établi en 1996 par McKeith et collaborateurs, le seul critère pour l'évaluation neuropathologique était la présence de CL dans le cerveau, associé avec un antécédent d'ACM dans la famille. Tout autre critère neuropathologique n'était ni inclusif ni exclusif. Cette méthode d'évaluation était un peu trop souple, puisque près de 60 % des patients atteints de MA étaient positifs à ce critère pathologique (McKeith et al., 2005). A partir des critères de 2005, il faut alors tenir compte de l'étendue de la pathologie Lewy, ainsi que de la présence d'une pathologie de type MA. Les patients présentant des CL de

manière concomitante à une pathologie de type MA, qui pourrait causer les symptômes cognitifs, sont alors considérés comme « peu probables » d'être atteints de MCL (McKeith et al., 2005).

Afin de mettre en évidence la pathologie de type Lewy, il est recommandé de réaliser un immunomarquage dirigé contre l' α -syn. C'est le marquage le plus spécifique et le plus sensible. En effet, le marquage hématoxyline éosine permet de marquer les CL présents dans le TC, mais est insuffisant pour marquer ceux présents dans le néocortex. De plus, il ne permet pas de mettre en évidence les NL. Le marquage ubiquitine ne peut être recommandé seulement dans le cas où la pathologie de type MA n'est pas importante car l'ubiquitine marque également les dégénérescence neurofibrillaires, qui sont alors facilement confondues avec des CL (McKeith et al., 2005).

Une classification semi-quantitative de la sévérité de la pathologie en fonction du marquage de l' α -syn est établie en attribuant un score allant de 0 à 4 : 0 = rien ; 1 = légère ; 2 = modérée ; 3 = sévère ; 4 = très sévère (**Figure 2**). Ce score est attribué dans différentes régions cérébrales permettant d'identifier le type de pathologie Lewy (**Tableau 2**) : diffus néocortical, limbique (transitionnel), TC prédominant, amygdale prédominant, et bulbes olfactifs (BO) uniquement. Récemment, la neuropathologie type MA a également été prise en compte afin d'estimer la probabilité (basse, intermédiaire, haute) que la pathologie Lewy soit associée à une MCL (**Tableau 2**) (McKeith et al., 2017). Pour cela, l'estimation de la neuropathologie MA est effectuée à partir des critères révisés lors du consensus de 2012 du « National Institute on Aging-Alzheimer's Association » (NIA-AA). Le « changement neuropathologique de type MA » peut être absent, bas, intermédiaire, ou élevé (**Tableau 2**), et il est évalué par une combinaison des scores attribués à : la pathologie plaques amyloïdes A β , la dégénérescence neurofibrillaire, et la pathologie plaques neuritiques (Montine et al., 2012). D'autre part, en estimant la perte de neurones dopaminergiques (aucune, légère, modérée, sévère), il est possible de sous-classer les cas avec ou sans un syndrome parkinsonien (McKeith et al., 2017).

Le type de pathologie Lewy correspondant davantage à un syndrome clinique de MCL est soit le type diffus néocortical, soit limbique (**Tableau 2**).

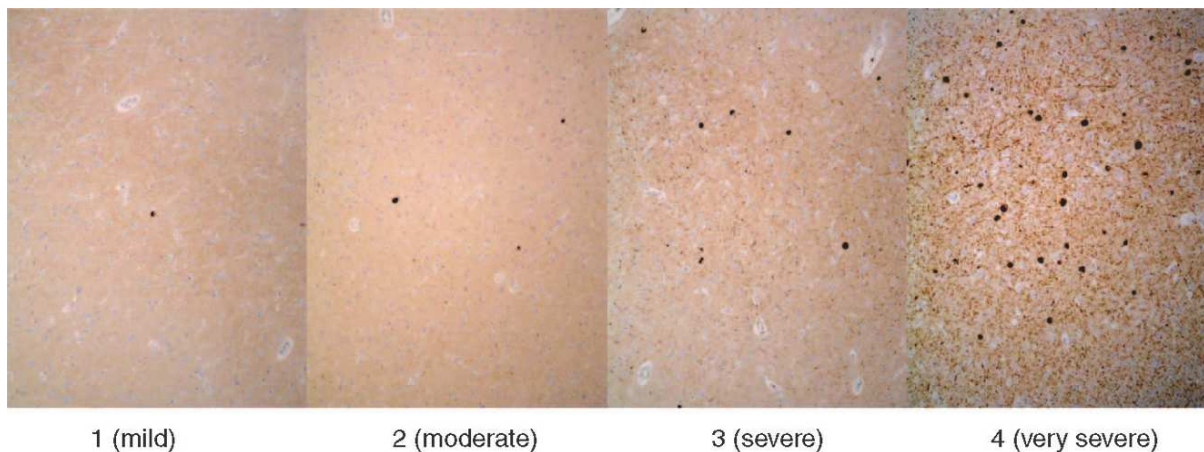


Figure 2. Scores de sévérité de la pathologie Lewy. Immunomarquage dirigé contre l' α -syn dans le cortex cérébral de patients MCL illustrant la sévérité croissante de la pathologie α -syn. Stade 1 : CL ou NL peu présents. Stade 2 : > 1 CL par champ à fort grossissement et peu de NL. Stade 3 : \geq 4 CL par champ à faible grossissement et NL dispersés. Stade 4 : nombreux CL et NL. CL, corps de Lewy ; MCL, maladie à corps de Lewy ; NL, neurites de Lewy. McKeith et al., 2005.

Changement neuropathologique de type MA	<i>NIA-AA absent/bas</i>	<i>NIA-AA intermédiaire</i>	<i>NIA-AA élevé</i>
Type de pathologie Lewy	Probabilité d'association au syndrome clinique MCL		
<i>Néocortical diffus</i>	Haute	Haute	Intermédiaire
<i>Limnique (transitionnel)</i>	Haute	Intermédiaire	Basse
<i>TC prédominant</i>	Basse	Basse	Basse
<i>Amygdale prédominant</i>	Basse	Basse	Basse
<i>BO uniquement</i>	Basse	Basse	Basse

Tableau 2. Evaluation de la probabilité que la neuropathologie détectée soit associée à un syndrome clinique de MCL. MA, maladie d'Alzheimer ; MCL, maladie à corps de Lewy ; NIA-AA, critères du « National Institute on Aging-Alzheimer's Association ». D'après McKeith et al., 2017.

c) L'insula

(1) *L'insula chez l'Homme*

L'insula, également appelée cortex insulaire (CI), est une structure corticale bilatérale, localisée sous la scissure latérale qui sépare les lobes frontal, temporal et pariétal (**Figure 3A**). Bien que découverte en 1796, elle n'a été que peu étudiée jusqu'à la fin du XXème siècle (Namkung et al., 2017a).

L'insula peut être séparée en parties antérieure et postérieure (**Figure 3A**), de par leur connectivité, leur fonction et également leur cytoarchitecture. Sur la base de la cytoarchitecture, on peut distinguer l'insula granulaire, dysgranulaire et agranulaire. Cette

subdivision se fait en fonction de la présence ou non de la couche IV du cortex (Cx) : le Cx **granulaire** possède les 6 couches corticales, l'insula **dysgranulaire** possède une couche IV plus mince, et l'**agranulaire** ne possède pas la couche IV. Chez l'Homme, la couche V de l'insula contient de gros neurones bipolaires appelés Von Economo, qu'on ne retrouve dans aucune autre région cérébrale. Leur fonction n'est pas connue mais on sait qu'ils ne sont présents que chez les animaux avec de gros cerveaux et des capacités de socialisation importantes (les grands singes, les éléphants, les baleines), ce qui laisse penser qu'ils pourraient être impliqués dans les fonctions émotionnelles et sociales (Gogolla, 2017).

L'insula **postérieure** (granulaire) reçoit des afférences de la moelle épinière et du tronc cérébral *via* le thalamus (**Figure 3B**), ainsi que des entrées des Cx associatifs pariétal, temporal et occipital. Cette partie joue donc un rôle d'intégration des informations somatosensorielles, motrices et vestibulaires. La partie **antérieure** (agranulaire) possède notamment des connexions réciproques avec des régions limbiques comme l'amygdale, le Cx cingulaire antérieur, le Cx préfrontal (CPF) dorsolatéral ainsi que le Str ventral et reçoit des afférences provenant de l'insula postérieure (**Figure 3B**). Ceci l'implique dans l'intégration d'informations autonomes et viscérales avec les fonctions émotionnelles, cognitives et motivationnelles. Le CI est une structure hyperconnectée (**Figure 3B**), et globalement on le considère comme étant impliqué dans l'intéroception (Namkung et al., 2017a).

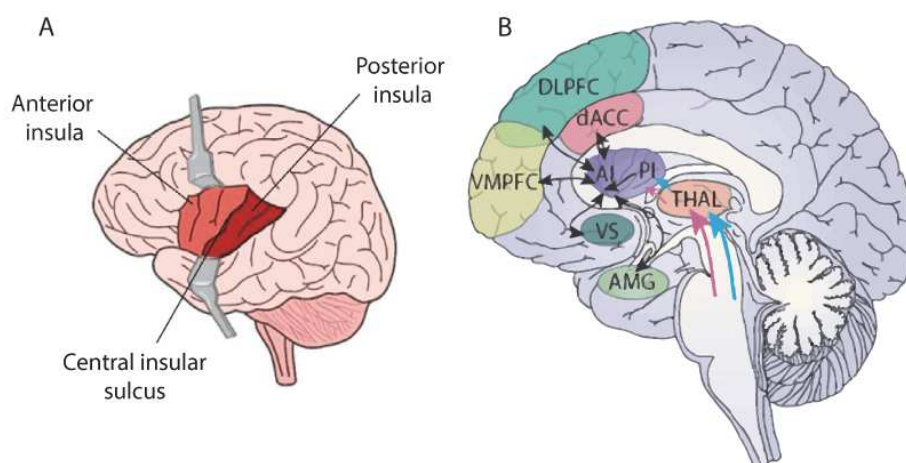


Figure 3. L'insula et ses connexions chez l'Homme. (A) L'insula, ou cortex insulaire, est divisée en deux parties par le sulcus central insulaire : l'insula antérieure et la postérieure. (B) La partie postérieure reçoit des afférences du thalamus et projette vers la partie antérieure. La partie antérieure est hautement connectée avec le cortex préfrontal ainsi qu'avec le striatum ventral et l'amygdale. AI, insula antérieure ; AMG, amygdale ; PI, insula postérieure ; dACC, cortex cingulaire antérieur dorsal ; DLPFC, cortex préfrontal dorsolatéral ; THAL, thalamus ; VMPFC, cortex préfrontal ventromédian ; VS, striatum ventral. D'après (A) Gogolla, 2017 et (B) Namkung et al., 2017.

(a) L'insula dans la MCL

Récemment, des études d'imagerie chez l'Homme ont montré que le CI était précocement atteint au niveau structurel chez des patients aux stades prodromaux de la MCL (Blanc et al., 2014, 2015 ; Roquet et al., 2017). Une de ces études met en évidence l'implication du CI ant droit comme région clé dans les hallucinations chez les patients atteints de MA, ou de pathologie mixte MA/MCL, cela en corrélation avec une diminution de la matière grise dans l'insula droite (Blanc et al., 2014). Une autre étude montre une atrophie des CI droit et gauche de patients aux stades prodromaux de la MCL, qui n'est pas observée chez des patients aux stades prodromaux de la MA (Roquet et al., 2017). L'atrophie des CI chez les patients MCL a également été observée par Lee et collaborateurs, de manière indépendante aux dépôts A β qui peuvent être observés chez certains patients MCL (Lee et al., 2018).

De plus, il a été montré que l'insula est une région particulièrement vulnérable au développement de la pathologie Lewy chez des patients à des stades avancés de MP et de MCL. De manière intéressante, c'est la partie antérieure du CI qui présente la pathologie la plus dense. Les neurones von Economo sont peu affectés par la pathologie à la différence des astrocytes (Fathy et al., 2019).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'insula pourrait être une région clé dans le développement des synucléinopathies et plus particulièrement de la MCL.

(2) L'insula chez le rongeur

Même si l'insula semble être une structure impliquée dans des fonctions mentales propres à l'Homme, de nombreuses caractéristiques fonctionnelles et anatomiques sont partagées par l'Homme et le rongeur (Gogolla, 2017 ; Gehrlach et al., 2020). En effet, on retrouve également la distinction cytoarchitecturale entre granulaire, dysgranulaire et agranulaire, mais dans une organisation différente à celle de l'Homme. En effet chez l'Homme, le CI agranulaire est en position antérieure, le granulaire en position postérieure, et le dysgranulaire est intercalé entre les deux. Chez la souris cependant, la couche granulaire est dorsale, puis on trouve la couche dysgranulaire, et la couche agranulaire est ventrale. Dans la partie la plus antérieure du CI du rongeur, il n'y a que de l'agranulaire. D'autre part, le CI est exposé sur la surface latérale du lobe temporal, et non enfouie sous le Cx comme chez l'Homme (**Figure 4A**) (Gogolla, 2017).

Le CI du rongeur, comme chez l'Homme, est hyperconnecté aux régions préfrontales (Cx cingulaire antérieure, orbitofrontal et médial) impliquées dans les fonctions cognitives, exécutives et émotionnelles. De plus, il projette vers des régions impliquées dans la motivation et la récompense comme le noyau accumbens ou l'aire tegmentale ventrale (**Figure 4B**). Une étude de connectivité récente, réalisée chez la souris, a mis en évidence d'importantes connexions intra-insulaires, majoritairement de la partie postérieure vers l'antérieure comme chez l'Homme. Il a également été observé que le CI ant est la partie du CI qui reçoit le plus d'afférences du CPF. C'est également la partie qui est le plus connectée au striatum (Str) puisqu'elle y envoie plus de 30 % de ses projections. Il n'y a pas de connexion réciproque avec le Str, cependant l'ensemble du CI est connecté réciproquement au thalamus et à l'amygdale. Ces trois structures subcorticales, avec les régions corticales sensorielles primaires (S1) et secondaires (S2), constituent les connexions majeures de l'insula chez le rongeur (Gehrlach et al., 2020).

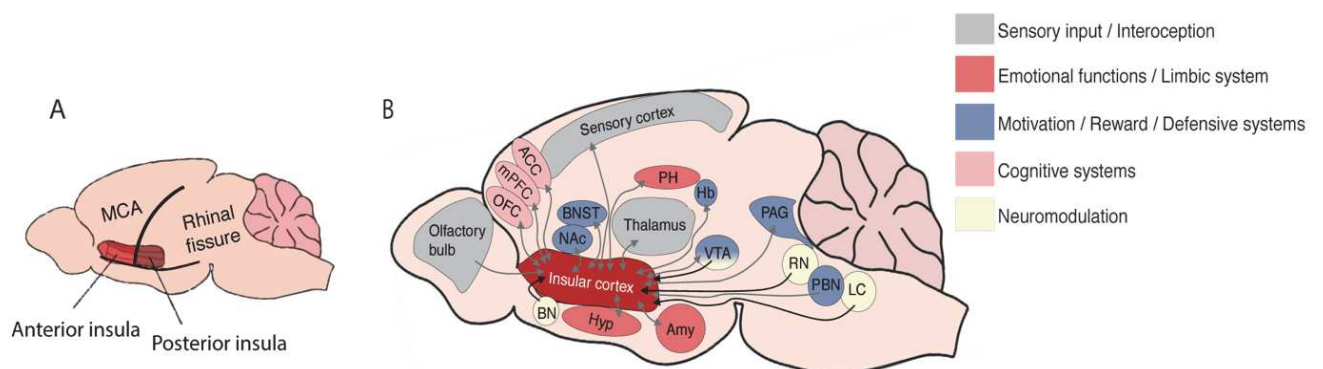


Figure 4. Le cortex insulaire et ses connexions chez le rongeur. (A) L'insula est exposée à la surface latérale du cortex. (B) L'insula possède des connexions réciproques avec les systèmes sensoriel, émotionnel, motivationnel et cognitif (flèches grises). Elle reçoit de fortes afférences neuromodulatrices (flèches noires) cholinergiques du noyau basal (BN), dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA), sérotoninergiques du noyau du raphé, et adrénérgiques du locus coeruleus (LC). ACC, cortex cingulaire antérieure ; Amy, amygdale ; BNST, noyau du lit de la strie terminale ; Hb, habenula ; Hyp, hypothalamus ; mPFC, cortex préfrontal médian ; NAc, noyau accumbens ; OFC, cortex orbitofrontal ; PAG, substance grise périaqueducale ; PBN, noyau parabrachial ; PH, parahippocampe. D'après Gogolla, 2017.

4. Stratégies thérapeutiques

a) Les traitements symptomatiques

Il n'existe aucun traitement pour la MCL, comme c'est le cas pour la plupart des maladies neurodégénératives, et donc l'essentiel de la prise en charge thérapeutique des patients vise à traiter les symptômes afin d'améliorer la qualité de vie des patients et des aidants. Ainsi le traitement de la MCL se concentre sur les symptômes cognitifs, psychiatriques, moteurs et d'autres symptômes majeurs tels que les troubles du sommeil paradoxal ou les troubles du système nerveux autonome (pour revues : Boot, 2015 ; Hershey et Coleman-Jackson, 2019).

(1) *Traitement des symptômes cognitifs*

L'acétylcholine est un neurotransmetteur fortement impliqué dans la modulation de la cognition. En effet, le noyau de neurones cholinergiques que constitue le prosencéphale basal envoie un grand nombre d'afférences vers le néocortex et le cortex limbique (Woolf, 2006). Chez les patients atteints de MCL, on peut observer une atteinte du prosencéphale basal, et plus particulièrement du noyau basal de Meynert (Grothe et al., 2014), comme c'est le cas chez des patients atteints de MA, et donc une déplétion de la neurotransmission cholinergique. Les **inhibiteurs d'acétylcholinestérase**, enzyme dégradant l'acétylcholine, permettent d'augmenter la quantité d'acétylcholine disponible dans le système nerveux central, et sont donc utilisés pour améliorer les fluctuations cognitives et attentionnelles, ainsi que les hallucinations visuelles des patients MCL. Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase sont la rivastigmine, la galantamine et le donepezil. Même s'il n'y a pas d'amélioration des capacités cognitives, au moins le traitement limite leur dégradation (Stinton et al., 2015 ; Wang et al., 2015).

La **mémantine** est utilisée chez les patients atteints de maladies neurodégénératives afin de limiter l'effet toxique d'une trop forte activité glutamatergique au niveau cortical. Elle agit en tant qu'antagoniste des récepteurs NMDA. La méta-analyse réalisée par Wang et collègues en 2015 ne montrait pas d'amélioration des troubles cognitifs chez les patients atteints de MCL grâce à la mémantine. Cependant elle améliore l'état clinique global du patient (Wang et al., 2015 ; Hershey et Coleman-Jackson, 2019).

(2) Traitement des symptômes psychiatriques

Les **antipsychotiques atypiques** sont utilisés pour le traitement des troubles anxieux et dépressifs ainsi que pour les hallucinations visuelles et les troubles délirants. Ils sont cependant utilisés uniquement si ces troubles altèrent profondément la vie du patient. En effet, ils sont associés à une aggravation du syndrome parkinsonien (antagonise les récepteurs dopaminergiques D2) et à un risque de mortalité plus élevé chez les patients atteints d'ACM, et particulièrement de MCL (McKeith et al., 2017).

La **pimavansérine** est un nouveau type d'antipsychotique atypique approuvé par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (« Food and Drug Administration ») en 2016. Il agit comme agoniste inverse des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A}. Comme il n'a que peu d'effet sur les autres récepteurs, il n'agit pas sur les récepteurs dopaminergiques D2 et histaminergiques, et donc n'aggrave pas le syndrome parkinsonien, tout en évitant l'effet de sédation qu'on observe classiquement avec l'administration des antipsychotiques (Hawkins et Berman, 2017). On peut donc l'utiliser chez les patients atteints de MCL.

(3) Traitement des symptômes moteurs

Le traitement avec le précurseur dopaminergique **levodopa** semblerait moins efficace chez les patients atteints de MCL comparé aux patients atteints de MP (McKeith et al., 2017). Cela est dû au fait que les patients MCL ne peuvent bénéficier que d'administrations en faibles doses de levodopa, au risque d'aggraver les hallucinations visuelles (Goldman et al., 2008). De ce fait le traitement levodopa ne présente qu'un bénéfice limité.

Le **zonisamide** est un antiépileptique approuvé au Japon pour le traitement de la MP. Il a été utilisé en combinaison au levodopa dans un essai clinique qui a montré une amélioration du syndrome moteur, sans aggravation des troubles psychiatriques ou cognitifs (Hershey et Coleman-Jackson, 2019 ; Murata et al., 2019).

b) L' α -syn comme cible thérapeutique

Comme l' α -syn est le principal composant des CL et semble jouer un rôle central dans la pathogénèse des synucléinopathies, elle constitue une cible thérapeutique particulièrement privilégiée. L' α -syn peut être ciblée à différents niveaux : la synthèse protéique, l'agrégation, la propagation ou bien la dégradation (**Figure 5**) (pour revue : Wong et Krainc, 2017).

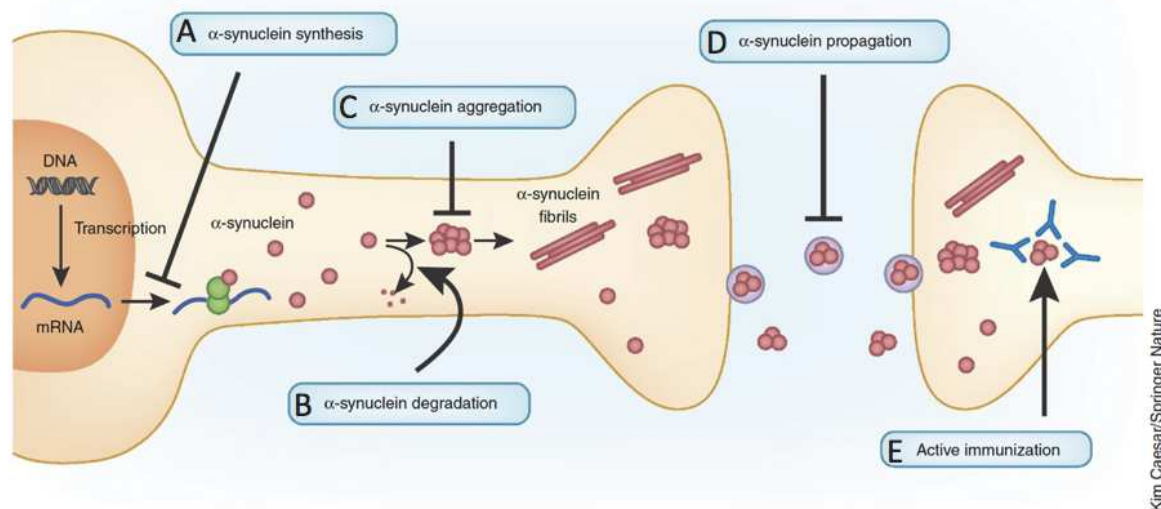


Figure 5. L' α -syn comme cible thérapeutique. De nombreuses voies ont été manipulées pour diminuer la toxicité de l' α -syn. Celles-ci incluent (A) la réduction de sa synthèse, (B) l'augmentation de sa dégradation, (C) la limitation de son agrégation, (D) le blocage de sa propagation, et (E) l'immunisation active contre l' α -syn. Wong et Krainc, 2017.

(1) Réduire la synthèse d' α -syn

La surexpression d' α -syn est une cause de son agrégation. De ce fait réduire sa synthèse permettrait d'éviter l'accumulation d' α -syn au sein des neurones et donc d'éviter la toxicité induite par les formes pathogènes de la protéine. Il a été montré par différentes études chez la souris que bloquer la synthèse d' α -syn en réduisant les ARN messagers (ARNm) permettait de diminuer le taux d' α -syn et ainsi de limiter la formation d'agrégats (**Figure 5A**). La technique d'interférence par ARN (petits ARN interférents) fonctionne bien mais n'est efficace que peu de temps (Lewis et al., 2008 ; Cooper et al., 2014). Toujours chez la souris, des études plus récentes ont montré l'efficacité des oligonucléotides antisens, plus stables que les petits ARN interférents (Alarcón-Arís et al., 2018 ; Cole et al., 2019). Cette efficacité peut encore être augmentée par la stabilisation des oligonucléotides antisens grâce à l'ajout

d'une liaison amine afin de former un « amino-bridged nucleic acid modified antisense oligonucleotide » (AmNA-ASO) (Uehara et al., 2019).

(2) Augmenter la dégradation de l' α -syn

Afin de réduire le taux d' α -syn il est également possible d'augmenter sa dégradation par les voies lysosomale et/ou autophagique (**Figure 5B**). Des études réalisées chez le rongeur mettent en avant plusieurs possibilités : la surexpression du facteur de transcription lysosomale TFEB ; l'immunisation passive avec des anticorps (Ac) dirigés contre l' α -syn ; l'augmentation de l'expression de l'enzyme lysosomale β -glucocérébrosidase (GCase) ; ou encore l'augmentation de l'expression d'autres protéines lysosomales (pour revue : Wong et Krainc, 2017). L'immunisation passive consiste à administrer directement des Ac qui ont été générés *in vitro* contre un antigène spécifique.

(3) Empêcher l'agrégation de l' α -syn

Réduire la formation des oligomères et des fibrilles d' α -syn (**Figure 5C**) permettrait à la fois de maintenir la fonction physiologique de la protéine, et d'empêcher la toxicité liée aux formes pathologiques de l' α -syn. Une étude en culture cellulaire a montré que de « petites molécules », comme la porphyrine phtalocyanine, peuvent stabiliser la conformation en hélice α de l' α -syn, afin d'empêcher son changement de structure secondaire en feuillet β , ce qui permet d'empêcher son agrégation (Fonseca-Ornelas et al., 2014). Un essai clinique a été réalisé sur une cohorte de patients atteints de MP afin de tester l'effet de la « petite molécule » Nilotinib qui vise à limiter l'agrégation de l' α -syn. Cet essai a montré une réduction de l' α -syn plasmatique et du taux d'oligomères présents dans le liquide céphalo-rachidien (Pagan et al., 2019).

(4) Empêcher la propagation de l' α -syn

Il a été montré que l' α -syn pouvait se propager à la manière d'une protéine prion pour étendre la pathologie à d'autres neurones voire d'autres structures cérébrales (**Figure 5D**). Empêcher la propagation de l' α -syn permettrait donc de ralentir ou limiter l'évolution de la

pathologie. Là encore l'immunisation passive se trouve être une méthode efficace dans des modèles murins (Games et al., 2014 ; Tran et al., 2014).

(5) L'immunisation active contre l' α -syn

L'immunisation active est en fait une vaccination : elle est réalisée en injectant *in vivo* un antigène, afin de stimuler le système immunitaire pour qu'il produise les Ac spécifiques (**Figure 5E**). En 2005, Masliah et ses collaborateurs avaient déjà testé cette technique sur des souris qui exprimaient l' α -syn en les immunisant contre l' α -syn. Ceci a eu pour effet de réduire l'accumulation d' α -syn sous forme agrégée, supposément en l'envoyant vers les voies de dégradations lysosomales, ainsi que de diminuer la neurodégénérescence (Masliah et al., 2005). La compagnie AffiRis confirmait en 2017 l'efficacité chez des patients atteints de MP de la molécule AFFITOPE® PD03A.

B. L' α -synucléine

1. Découverte de l' α -synucléine

En 1988, Maroteaux et collègues publièrent une étude dans laquelle ils décrivent avoir isolé une protéine intracellulaire de 143 acides aminés (AA) à partir de vésicules synaptiques cholinergiques provenant d'une raie électrique, la *Torpedo californica*. Ils ont également identifié chez le rat une protéine de 140 AA présentant une haute homologie avec celle de la raie. Les chercheurs expliquent avoir observé cette protéine uniquement dans les neurones, localisée à la fois dans le noyau mais également au niveau de la terminaison présynaptique. Ils ont donc appelé cette protéine la « synucléine » (« syn- » pour synapse, et « -nucléine » pour noyau). La localisation subcellulaire de l' α -synucléine (α -syn) a depuis été confirmée dans le noyau et les terminaisons présynaptiques majoritairement, mais également dans le cytoplasme – particulièrement dans les mitochondries – et l'axone (Zhang et al., 2008).

Plus tard, une analyse des plaques séniles issues d'un cerveau de patient atteint de MA a mis en évidence deux peptides en plus de l'A β , présentant une propension à former des feuillets β . Ces peptides ont été nommés « composés non-A β des plaques amyloïdes » ou NAC (Non-A β Component). Deux Ac spécifiques à chacun de ces peptides ont ensuite été générés et ont permis d'isoler une protéine de 140 AA dont la séquence comportait celles des deux peptides identifiés plus tôt. Cette protéine a donc été nommée NAC précurseur (NACP). Elle est présente dans tous les tissus, à l'exception du foie, et de façon prédominante dans le cerveau, suggérant un rôle particulièrement important de la NACP dans le cerveau (Ueda et al., 1993).

Une étude publiée en 1994 décrit deux protéines purifiées et séquencées à partir du cerveau humain. La première de 140 AA était identique à la NACP, et la séquence protéique possédait une haute homologie avec les synucléines de 143 AA et 140 AA issues de la *Torpedo californica* et du rat. La deuxième protéine identifiée faisait 134 AA et présentait 61 % d'homologie avec celle de 140 AA, suggérant qu'elles appartenaient toutes deux à la même famille. La protéine de 140 AA a alors été nommée « α -syn », et celle de 134 AA « β -synucléine » (β -syn). Ces deux protéines sont majoritairement exprimées dans le cerveau, et de manière prédominante au niveau des terminaisons pré-synaptiques (Jakes et al., 1994). De

plus l' α -syn humaine est plus particulièrement exprimée dans le néocortex, l'hippocampe, la SN, le thalamus et le cervelet (Yu et al., 2007).

Enfin une dernière protéine de la famille des synucléines, la γ -synucléine, a été identifiée chez l'Homme en forte concentration dans les ovaires et les carcinomes de la poitrine (Bruening et al., 2000), ainsi que dans le système nerveux périphérique (George, 2002).

En 1995, Spillantini et collègues publièrent la localisation chromosomique des gènes codant pour l' α -syn et la β -syn : respectivement le gène SNCA pour « synuclein α » en position 21 du bras long du chromosome 4 (4q21), et SNCB pour « synuclein β » en position 35 du bras long du chromosome 5 (5q35) (Spillantini et al., 1995).

2. Structure de l' α -syn

La séquence primaire d'AA est divisée en trois parties (Breydo et al., 2012) :

- Le **domaine N-terminal** (Nt) : résidus 1 à 60, contenant 4 répétitions imparfaites de 11 AA avec un motif conservé « KTKEGV ». Cette région est enrichie en charges positives (AA basiques) (**Figure 6A**). Elle peut prendre la forme d'une **hélice α amphiphile** (**Figure 6B**) grâce au motif KTKEGV dans lequel les charges positives et négatives sont alternées.
- Le **domaine central** : résidus 61 à 95, contenant 3 répétitions supplémentaires avec le motif « KTKEGV » et la région NAC (**Figure 6A**), hautement hydrophobe et impliquée dans l'agrégation de l' α -syn. Cette partie peut donc prendre la forme d'un **feuillet β** (**Figure 6B**) (Rodriguez et al., 2015).
- Le **domaine C-terminal** (Ct) : résidus 96 à 140, région enrichie en charges négatives (AA acides) et résidus prolines (**Figure 6A**). Cette région ne forme pas de structure secondaire (**Figure 6B**), on parle alors de « **random coil** » (littéralement « bobine au hasard »).

*Il faut savoir que dans un grand nombre d'études le domaine central est appelé « NAC » (**Figure 6A**), et que ce domaine est souvent compris dans l'appellation « N-terminal ».*

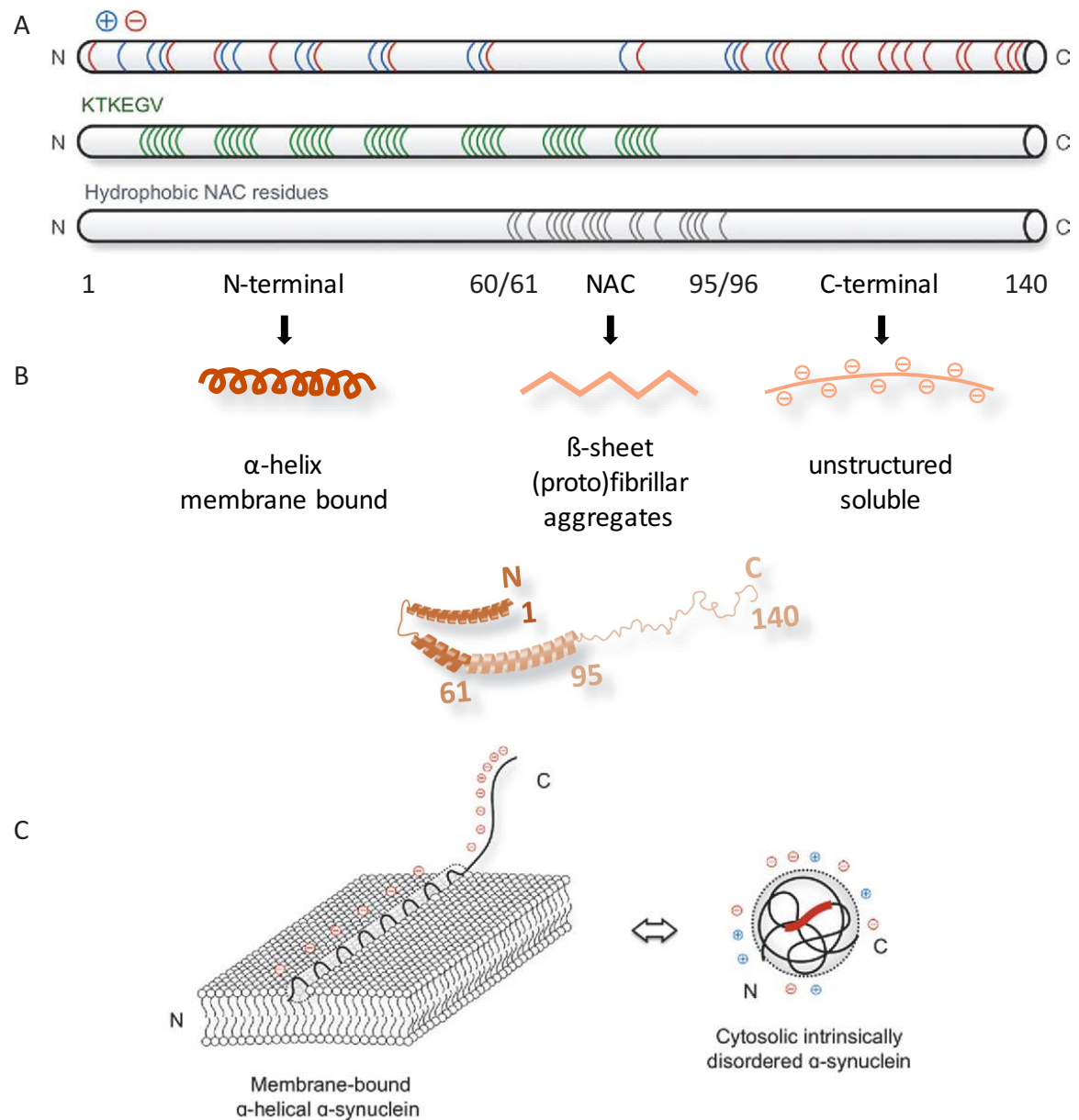


Figure 6. Structure de l' α -syn et conformations membranaire et cytosolique. L' α -syn est une protéine avec une haute flexibilité conformationnelle qui est due à sa structure. (A) Elle comprend trois domaines : N-terminal riche en charges positives, NAC hydrophobe et C-terminal chargé négativement. La haute densité en charges électriques combinée à l'hydrophobicité du domaine central confère à l' α -syn une conformation désordonnée cytosolique comme illustré en (C). (B) Les différents domaines de l' α -syn ont chacun une tendance naturelle à prendre des structures secondaires différentes : hélice α pour la partie Nt, feuillet β favorisant l'agrégation pour la partie NAC, et structure désordonnée pour la partie Ct. La conformation en hélice α permet à l' α -syn de s'insérer dans la bicouche lipidique en exposant ses charges négatives à l'extérieur (C). (C) Il existe un équilibre dynamique entre la conformation liée aux membranes et la conformation cytosolique. D'après Peelaerts et Outeiro, 2017 et Vamvaca et al., 2009.

Les parties N-terminale et « NAC » contiennent des domaines de liaison à la membrane, alors que la partie C-terminale contient des sites d'interaction protéine-protéine ou protéine-petites molécules (Breydo et al., 2012). Cette dernière partie joue également un rôle important dans la fonction chaperonne de la protéine (Souza et al., 2000 ; Ottolini et al., 2017).

L' α -syn dans sa forme native, c'est à dire en conditions physiologiques, est essentiellement monomérique, cytosolique et n'a pas de structure ordonnée, on dit qu'elle est **désordonnée (Figure 6C)** (Weinreb et al., 1996 ; Uversky, 2003 ; Fauvet et al., 2012 ; Burré et al., 2013 ; Gurry et al., 2013). L' α -syn prend la forme d'**hélice α** lorsqu'elle interagit avec des membranes (**Figure 6A**) (Davidson et al., 1998), une interaction qui a lieu préférentiellement avec les membranes contenant des acides gras insaturés et une courbure importante, comme les vésicules ou les liposomes par exemple (Wang et al., 2010). Il a été suggéré que l' α -syn native n'existe pas uniquement sous forme de monomères, mais également sous forme de multimères métastables (Gould et al., 2014), particulièrement à la synapse (Wang et al., 2014). Plusieurs études supportent même que l' α -syn isolée de cellules de mammifères ou de cellules recombinantes existerait de manière prédominante sous forme de tétramères solubles riches en hélices α (Bartels et al., 2011 ; Wang et al., 2011 ; Dettmer et al., 2013). Il a été suggéré que la conformation en tétramère permettrait de stocker l' α -syn monomérique non liée à des membranes lorsque sa concentration est élevée, afin d'éviter son agrégation (Gurry et al., 2013).

Il est important de connaître la structure d'une protéine afin d'en comprendre la pathologie, car une protéine avec une structure stable et ordonnée est moins sujette à l'agrégation qu'une protéine à la structure labile (Burré et al., 2013). L'ensemble de ces données démontre que l' α -syn possède une plasticité conformationnelle importante, qui est influencée par divers facteurs comme la charge des phospholipides, les modifications post-transcriptionnelles ou encore les interactions avec d'autres protéines (Gould et al., 2014).

3. Fonctions physiologiques de l' α -syn

La fonction de l' α -syn n'est pas complètement comprise, mais elle semblerait être dirigée au niveau de la terminaison présynaptique. Sa localisation dans le noyau neuronal laisse également supposer une fonction physiologique importante à ce niveau (Yu et al., 2007).

a) Rôle de l' α -syn au niveau synaptique

La manière classique de connaître le rôle d'une protéine est d'empêcher son expression au sein d'un organisme. De ce fait, des modèles rongeurs de « knock-out » (KO) de gènes d'intérêts sont réalisés. On peut alors étudier le phénotype du modèle qui n'exprime pas la protéine d'intérêt afin d'en identifier les fonctions. Abeliovitch et collègues ont ainsi réalisé un modèle murin KO de l' α -syn en 2000, stade auquel la protéine avait déjà été identifiée dans les CL (Spillantini et al., 1997). Du fait de l'altération spécifique du système dopaminergique nigrostriatal dans la MP, l' α -syn était supposée être particulièrement impliquée dans la neurotransmission dopaminergique. Les observations faites chez les souris déficientes en α -syn, âgées de 3 à 6 semaines, ne montrent pas d'altérations morphologiques et fonctionnelles des synapses au sein du cerveau. Il n'y a pas non plus d'altération du système dopaminergique. Ces résultats suggèrent que l' α -syn n'est nécessaire ni au développement neuronal et à la formation des synapses, ni à la neurotransmission dopaminergique (Abeliovich et al., 2000).

Le terme de « dépression synaptique à court terme » décrit le fait qu'après une stimulation d'un neurone, une stimulation successive entraîne un relargage moins important de neurotransmetteurs. Cette dépression synaptique à court terme serait une conséquence de la déplétion d'un « pool » de vésicules prêtes à être exocytées. Il a été montré *in vitro* grâce au modèle KO, que l' α -syn module cette dépression synaptique à court terme pour les neurones dopaminergiques striataux. De plus, la déplétion d' α -syn a également induit une diminution du taux de dopamine striatale (Abeliovich et al., 2000).

(1) *Régulation du pool de vésicules d'exocytose*

Une partie de l' α -syn présynaptique est en fait localisée dans les vésicules synaptiques. Plus précisément, elle serait présente dans une sous-population de vésicules synaptiques uniquement (non définie), comme suggéré par Lee et ses collaborateurs grâce à une technique

d'immunoisolation de vésicules synaptiques à partir d'homogénats de cerveaux de rats (Lee et al., 2008). Il avait été montré que sans α -syn, le réapprovisionnement en vésicules d'exocytose dans la zone active de la synapse (**Figure 7A**) était plus lent. Il a donc été suggéré que l' α -syn pourrait être impliquée dans la synthèse et la maintenance du « pool » de réserve des vésicules d'exocytose (**Figure 7B**), ainsi que de leur acheminement dans la zone active (Cabin et al., 2002). Cette hypothèse est soutenue par les résultats de Zhang et ses collègues en 2008 qui, grâce à un marquage immunogold de l' α -syn, avaient localisé l' α -syn regroupée au niveau du « pool » distal de vésicules synaptiques, c'est à dire le « pool » de réserve (**Figure 7B**). Il n'a été observé que peu de particules d'or à proximité des membranes présynaptique et postsynaptique (Zhang et al., 2008). La surexpression d' α -syn dans des neurones en culture a quant à elle entraîné une diminution de l'exocytose de neurotransmetteurs (Nemani et al., 2010) ainsi que des vésicules synaptiques élargies (Scott et al., 2010). Cela a également causé un défaut du recyclage des vésicules (**Figure 7C**), entraînant une diminution de la taille du « pool » de réserve et de la densité de vésicules d'exocytoses présentes dans la zone active (Nemani et al., 2010). De plus, il existe un trafic intersynaptique des vésicules, aussi appelé « superpool », qui serait inhibé par un excès d' α -syn (**Figure 7D**) (Scott et Roy, 2012), ce qui contribuerait à la réduction du pool de réserve. L' α -syn est donc fortement impliquée dans le cycle des vésicules d'exocytose.

(2) *Chaperonne du complexe SNARE*

L' α -syn joue un rôle important dans l'exocytose des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, un processus qui nécessite la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique. Pour cela plusieurs protéines de fusion entrent en jeu, et notamment celles du complexe SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) qui s'assemblent et se désassemblent pour chaque exocytose. C'est à ce moment qu'intervient l' α -syn en tant que protéine chaperonne. En effet, comme expliqué précédemment, elle possède un domaine Ct lui permettant d'interagir avec d'autres protéines, et plus spécifiquement avec l'extrémité Nt de la synaptobrevine-2 qui est une v-SNARE. De cette manière elle promeut l'assemblage du complexe SNARE (**Figure 7**). D'autre part, une étude a montré que l' α -syn interagirait de manière indirecte sur le complexe SNARE, en se liant à l'acide arachidonique, lui-même lié au complexe SNARE (Darios et al., 2010).

Pour que l' α -syn puisse jouer cette fonction de protéine chaperonne du complexe SNARE, elle doit être liée à la membrane sous forme multimérique. En effet, elle ne peut pas jouer ce rôle sous sa forme cytosolique monomérique (Burré et al., 2014). Grâce à sa capacité à former des multimères, l' α -syn génère des « clusters » de vésicules d'exocytose (Wang et al., 2014). Si les multimères sont localisés à proximité de la zone active du neurone présynaptique, ils pourraient promouvoir la formation des complexes SNARE et ainsi favoriser la neurotransmission (Burré, 2015).

Au niveau des synapses de souris triple KO pour les trois formes de synucléine (α , β , γ), il a été observé une diminution âge-dépendante de l'assemblage du complexe SNARE, associée à des troubles moteurs sévères. Les jeunes souris triple KO ne présentaient cependant pas de déficits, suggérant l'importance des synucléines dans l'assemblage du complexe au cours de vieillissement. L'ajout d' α -syn à des neurones de souris triple KO en culture permet d'augmenter de manière dose dépendant l'assemblage du complexe SNARE. Ces résultats suggèrent que l' α -syn est importante au maintien de l'assemblage du complexe SNARE et plus particulièrement au cours du vieillissement (Burré et al., 2010).

Ainsi, même si la littérature démontre que l' α -syn n'est pas nécessaire à la neurotransmission, elle y participe, et il semblerait que ce soit en agissant sur le pool de vésicules d'exocytoses et en potentialisant l'assemblage du complexe SNARE.

(3) Rôle de l' α -syn dans l'endocytose

L' α -syn peut induire et « sentir » la courbure des membranes. Cette capacité pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes d'exocytose dans lesquelles l' α -syn est impliquée, comme décrit ci-dessus, mais également dans les mécanismes d'endocytose. Cependant cette capacité n'est possible que lorsque la protéine se trouve sous sa forme monomérique (Westphal et Chandra, 2013).

L'endocytose est nécessaire pour le recyclage des vésicules synaptiques, avec tous leurs composants, afin de maintenir le pool de réserve des vésicules, de préserver l'intégrité fonctionnelle et structurelle de la membrane présynaptique, et donc d'assurer le bon fonctionnement de la neurotransmission (Huang et al., 2019). Il semblerait que les protéines participant à l'exocytose soient impliquées dans l'endocytose – en plus du fait que l'exocytose

soit nécessaire au déclenchement de l'endocytose (Wu et al., 2014). C'est pourquoi on peut observer une inhibition de l'endocytose en condition d' α -syn pathologique (surexpression / mutation) (**Figure 7C**) (Xu et al., 2016). Cette inhibition de l'endocytose des membranes est médiée par la partie Nt de l' α -syn (Busch et al., 2014).

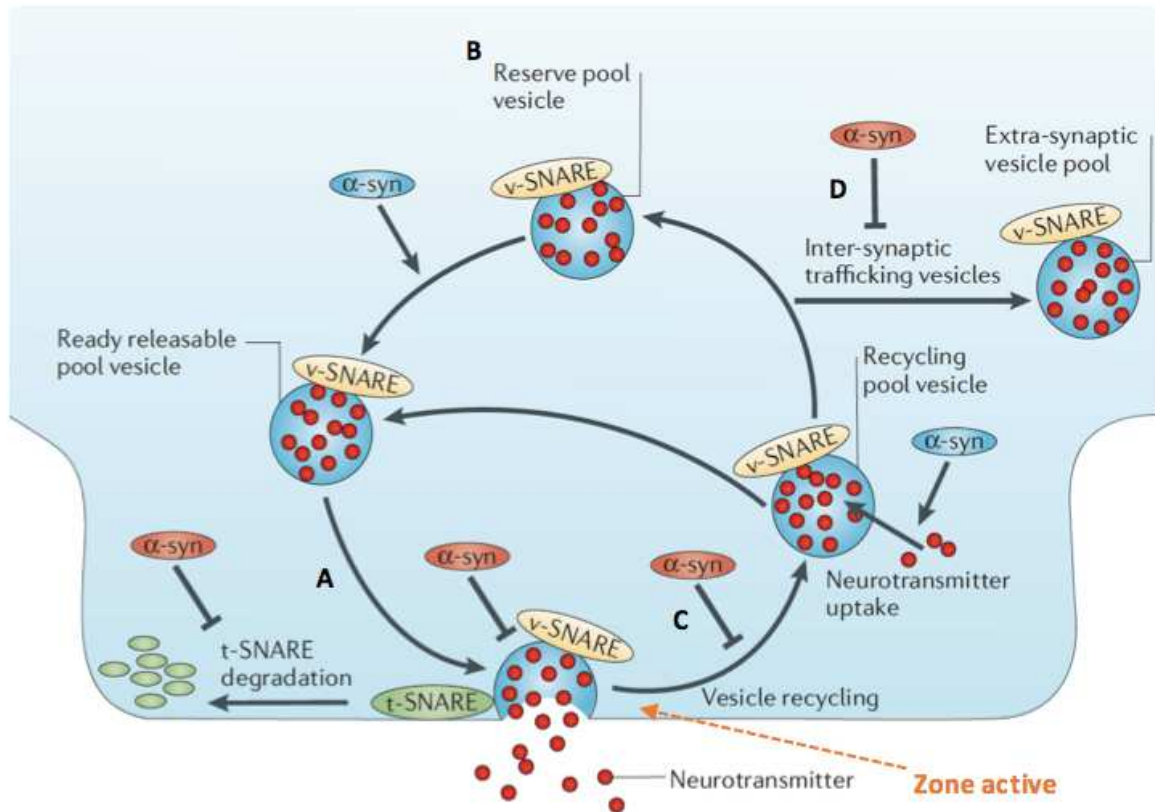


Figure 7. Propriétés fonctionnelles de l' α -syn à la synapse. L' α -syn joue un rôle dans le trafic vésiculaire, ainsi que dans l'interaction entre les t-SNARE et les v-SNARE permettant l'exocytose des neurotransmetteurs. L'accumulation d' α -syn peut quant à elle altérer l'exocytose des neurotransmetteurs, le recyclage des vésicules synaptiques et le trafic des vésicules inter-synaptiques, ainsi qu'influencer la stabilité du complexe t-SNARE. D'après Lashuel et al., 2013.

b) Rôle de l' α -syn dans le noyau

L' α -syn n'est pas trouvée uniquement dans les terminaisons présynaptiques mais également au sein du noyau du neurone (Maroteaux et al., 1988 ; Goers et al., 2003 ; Huang et al., 2011 ; Ma et al., 2014 ; Pinho et al., 2019). À ce jour il n'existe pas de consensus sur les interactions qu'effectue l' α -syn au sein du noyau neuronal, ni sur le rôle physiologique qu'elle y joue. Dans la littérature, la fonction nucléaire de l' α -syn au sein du noyau est majoritairement décrite en conditions pathologiques (pour revue : Wales et al., 2013).

c) Rôle de l' α -syn dans le cytoplasme

(1) *Métabolisme de la dopamine et neurones dopaminergiques*

L' α -syn bloque la production de dopamine (DA) en inhibant son enzyme de synthèse, la tyrosine hydroxylase (TH) (Yu et al., 2004 ; Li et al., 2011). L' α -syn n'agit pas directement sur la TH, en fait elle se lie à la protéine phosphatase 2A (PP2A) et active sa fonction de phosphatase. Celle-ci va à son tour déphosphoryler la TH (qui est phosphorylée sur la sérine 40). Ainsi le maintien de la TH dans sa forme déphosphorylée permet d'inhiber la synthèse de DA (Perez et al., 2002 ; Peng et al., 2005 ; Lou et al., 2010).

L' α -syn peut également contrôler le niveau de DA intraneuronale en agissant sur les DAT (transporteur dopamine). Les DAT sont localisés à la membrane présynaptique et permettent la récupération de la DA présente dans la fente synaptique. L' α -syn réduit la recapture de la DA en diminuant l'activité des DAT, et de cette manière elle diminue la quantité de dopamine présynaptique (Wersinger et Sidhu, 2003).

L' α -syn agit également sur les neurones dopaminergiques de manière indirecte en y inhibant l'activité de la protéine kinase C (PKC). De cette manière elle inhibe indirectement la cascade apoptotique et protège ainsi les neurones dopaminergiques de la mort cellulaire (Jin et al., 2011).

(2) *Rôle de chaperonne*

La partie Nt de l' α -syn possède 40 % d'homologie en termes de séquence avec celle des protéines 14-3-3 (Ostrerova et al., 1999), famille de protéines chaperonnes cytoplasmiques et ubiquitaires. Comme l' α -syn se lie à ces protéines ainsi qu'à une partie de leurs cibles, l'hypothèse que l' α -syn possédait également une activité de type chaperonne a été évoquée (Souza et al., 2000). Souza et collaborateurs ont donc étudié cette possibilité en analysant l'impact de l' α -syn dans un test typiquement utilisé pour déterminer l'activité chaperonne d'une protéine : l'agrégation de protéines substrats induite par la dénaturation thermique ou chimique. Sans présence de protéines chaperonnes, les protéines substrats s'agrègent lorsque la température est augmentée ou lors de l'ajout d'un agent chimique. Il a été observé que l' α -syn empêche cette agrégation, mettant donc en évidence son activité de type chaperonne. La même année, une étude similaire publiée par Kim et collaborateurs

apportait la même conclusion, en plus de montrer qu'un changement de conformation de l' α -syn altérerait sa fonction de chaperonne (Kim et al., 2000).

L' α -syn ne peut pas exercer sa fonction de chaperonne sans sa partie Ct (Souza et al., 2000). Afin de déterminer si la partie Ct est suffisante pour l'activité chaperonne, Park et collaborateurs ont généré deux formes mutées de l' α -syn, dans le but de comparer leur activité chaperonne à celle de la protéine non mutée. La première forme contient uniquement la partie Ct et dans la deuxième forme il manque uniquement la partie Nt. Il s'avère que la partie Ct est nécessaire mais pas suffisante pour que l' α -syn joue son rôle de chaperonne. La protéine composée de NAC-Ct quant à elle garde son activité chaperonne. Ce serait donc la partie NAC qui serait impliquée dans la liaison au substrat, et la partie Ct qui empêcherait l'agrégation. Les petites molécules chaperonnes empêchent l'agrégation d'autres protéines en formant des complexes solubles de haut poids moléculaire. L' α -syn agit également de cette manière, et c'est la partie Ct qui permet de maintenir ce complexe soluble (Park et al., 2002).

Une autre étude a mis en évidence le rôle de chaperonne de l' α -syn dans un modèle murin déficient en CSP α , une co-chaperonne du complexe SNARE qui stabilise SNAP25 (Chandra et al., 2005). Les souris déficientes en CSP α présentent une NDG létale. La surexpression transgénique d' α -syn WT (humaine ou murine) ou mutée (A53T) sous le promoteur mThy-1 a permis d'éviter la NDG létale, et ceci en chaperonnant le complexe SNARE, dont l'assemblage était inhibé en l'absence de CSP α (Chandra et al., 2005 ; Burré et al., 2010).

Les terminaisons synaptiques sont le lieu d'un important trafic membranaire nécessaire à la transmission synaptique, et fonctionnent de manière autonome par rapport au corps cellulaire. Afin que ce système reste efficace de manière durable, il est nécessaire d'avoir des mécanismes de contrôle de la qualité des protéines agissant au niveau des terminaisons nerveuses (Chandra et al., 2005). Ces mécanismes de contrôle comportent les molécules chaperonnes qui ont pour fonction, *via* leur interaction, de stabiliser les protéines partiellement ou totalement dépliées, c'est à dire lorsqu'elles sont en cours de synthèse, qu'elles traversent une membrane ou lorsqu'elles sont endommagées. C'est pourquoi beaucoup de molécules chaperonnes sont surexprimées en cas de stress biologique. Elles font partie de la famille des « heat shock protein » (HSP) (Leroux et al., 1997).

4. Pathologie de l' α -syn

La plupart des maladies neurodégénératives sont des protéinopathies, c'est à dire qu'elles présentent une pathologie d'une ou plusieurs protéines qui prennent une mauvaise conformation, s'agrègent éventuellement et induisent des déficits neuronaux, menant finalement à la mort neuronale. Un point qui est toujours controversé est de savoir si l'agrégation des protéines est un moyen de protéger le système nerveux en séquestrant les espèces toxiques insolubles, ou si ces agrégats insolubles sont eux-mêmes neurotoxiques.

L' α -syn a été identifiée comme le composant majeur des corps de Lewy et des neurites de Lewy en 1997 (Spillantini et al., 1997). C'est une protéine intrinsèquement désordonnée, et normalement ces protéines possèdent des séquences primaires qui préviennent l'agrégation de la protéine. En effet, elles sont souvent enrichies en résidus chargés et en prolines et ne possèdent pas de long domaines hydrophobes (Radivojac et al., 2007). Comme expliqué dans la « Structure de l' α -syn » (p.24), le domaine NAC de l' α -syn est hydrophobe et le plus prompt à l'agrégation, mais il est protégé par les charges positives et négatives des extrémités Nt et Ct. En effet, l' α -syn semble exhiber des conformations dynamiques stabilisées par des interactions à longues distances au sein de la protéine, qui lui donnent un certain degré de compaction (Bertoncini et al., 2005). Ces interactions, qui ont lieu entre l'extrémité Ct et la région NAC, et entre les extrémités Nt et Ct, préviendraient l'agrégation. Cependant certains facteurs internes et externes variés (changement environnementaux, mutations, modifications post traductionnelles...) peuvent induire un changement de conformation de l' α -syn et donc moduler l'agrégation de celle-ci.

a) Mutations, surexpressions et modifications post-traductionnelles

(1) *Mutations et surexpressions d' α -syn*

Plusieurs **mutations faux sens** du gène SNCA de l' α -syn ont été identifiées dans des formes de MP autosomales dominantes. Les trois premières identifiées furent A53T (Polymeropoulos et al., 1997), A30P (Krüger et al., 1998) et E46K (Zarranz et al., 2004), puis H50Q (Appel-Cresswell et al., 2013 ; Proukakis et al., 2013), G51D (Kiely et al., 2013 ; Lesage et al., 2013) et A53E (Pasanen et al., 2014). Ces mutations, toutes localisées dans la partie Nt, peuvent entraîner des modifications de la structure secondaire de l' α -syn et donc impacter ses

interactions et fonctions. Des duplications (Chartier-Harlin et al., 2004a ; Ibáñez et al., 2004) ou triplications (Singleton et al., 2003 ; Farrer et al., 2004) du gène de l' α -syn résultant en une surexpression de la protéine ont également été décrites comme impliquées dans les formes familiales de MP. Il semblerait que cette surexpression soit suffisante pour induire une pathologie de type Lewy de manière diffuse et sévère (Singleton et al., 2003 ; Chartier-Harlin et al., 2004b ; Farrer et al., 2004 ; Ross et al., 2008).

Il a été observé que les mutations peuvent impacter la capacité de liaison de l' α -syn aux membranes, par conséquent sa localisation subcellulaire, ainsi que sa propension à s'agréger *in vitro* (**Tableau 3**). Ceci n'est pas étonnant puisque la partie Nt permet la liaison aux membranes, et interagit également avec le domaine Ct permettant de « protéger » la partie NAC hydrophobe prompt à entraîner l'agrégation de l' α -syn (Bertoncini et al., 2005).

Effet de la mutation de l'α-syn vs WT	A30P	E46K	H50Q	G51D	A53E	A53T
Interaction membranes	↘ <i>Jo et al., 2002</i> <i>Bodner et al., 2010</i>	↗ <i>Choi et al., 2004 ;</i> <i>Fredenburg et al., 2007 ;</i> <i>Bodner et al., 2010 ;</i> <i>Tsigelny et al., 2015</i>	↗ <i>Tsigelny et al., 2015</i>	↘ <i>Fares et al., 2014</i>	↘ <i>Ghosh et al., 2014</i>	↗ <i>Tsigelny et al., 2015</i>
Agrégation	↗ oligomères <i>Conway et al., 1998</i>	↗ <i>Choi et al., 2004 ;</i> <i>Greenbaum et al., 2005</i>	↗ <i>Ghosh et al., 2013 ;</i> <i>Rutherford et al., 2014</i>	↘ <i>Fares et al., 2014 ;</i> <i>Rutherford et al., 2014</i>	↘ <i>Ghosh et al., 2014 ;</i> <i>Rutherford et Giasson., 2014</i>	↗ <i>Conway et al., 1998 ;</i> <i>Li et al., 2001</i>
Localisation cellulaire	+ noyau <i>Gonçalves et Outeiro, 2013</i>	noyau + cytoplasme <i>Gonçalves et Outeiro, 2013</i>	= WT <i>Khalaf et al., 2014</i>	+ noyau <i>Fares et al., 2014</i>	?	+ cytoplasme <i>Gonçalves et Outeiro, 2013</i>

Tableau 3. Mutations autosomales dominantes liées aux synucléinopathies et leurs effets sur l'interaction de l' α -syn avec la membrane, son agrégation et sa localisation cellulaire. ↘ diminue ; ↗ augmente ; = pareil comparé à l' α -syn WT. WT, wild-type.

(2) Modifications post-traductionnelles

En plus des mutations, les **modifications post traductionnelles** (MPT) peuvent aussi avoir un effet sur la conformation et donc les interactions de l' α -syn, son agrégation et sa toxicité. Les différents types de MPT pouvant se produire sur l' α -syn sont : la phosphorylation, la nitration, l'ubiquitination, la sumoylation, la troncation et l'acétylation N-terminal.

La phosphorylation est la MPT la plus étudiée. Elle a été identifiée *in vivo* et *in vitro* sur plusieurs résidus sérine (Ser) et tyrosine (Tyr) : Ser87, Tyr125, Ser129, Tyr133 et Tyr136. Le fait que quatre de ces sites de phosphorylation soient localisés sur la partie Ct (AA 96-140), suggère un impact de ces modifications sur les interactions protéines-protéines et protéines-ligand de l' α -syn (Oueslati et al., 2010). Selon la kinase et le résidu ciblé, la phosphorylation induit différents effets (**Tableau 4**). La phosphorylation de l' α -syn sur la sérine 129 (α -syn pS129) est la plus répandue (Okochi et al., 2000), mais son rôle est à ce jour toujours controversé. En effet, elle pourrait être neurotoxique : elle accélérerait la formation des inclusions ainsi que la toxicité et la mort neuronale selon plusieurs modèles cellulaires (Smith et al., 2005 ; Sugeno et al., 2008) ou un modèle drosophile (Chen et Feany, 2005). D'autre part, elle pourrait réduire la quantité d'oligomères toxiques, empêcher l'agrégation (Paleologou et al., 2008 ; Azeredo da Silveira et al., 2009), ou également promouvoir la clairance des formes mal repliées et toxiques de l' α -syn (Oueslati et al., 2013).

Malgré ce manque de consensus concernant le rôle de cette MPT, l' α -syn pS129 est considérée comme étant un **marqueur des synucléinopathies**, et est couramment utilisée en immunohistochimie afin de mettre en évidence les CL ou des agrégats type CL (**Figure 8**). Pour soutenir cette hypothèse selon laquelle l' α -syn pS129 est fortement impliquée dans les synucléinopathies, quel que soit son rôle, il est important de souligner qu'il y a un enrichissement en α -syn pS129 dans les CL de patients atteints de synucléinopathies (Fujiwara et al., 2002 ; Anderson et al., 2006 ; Muntané et al., 2012). En effet, environ 90 % de l' α -syn présente dans les CL est phosphorylée sur la sérine 129 (Fujiwara et al., 2002), alors que dans un cerveau sain, seulement 4 % de l' α -syn totale présenterait cette modification (Hasegawa et al., 2002 ; Oueslati, 2016). Il est tout de même recommandé d'utiliser en plus d'autres marqueurs d'agrégats pour identifier la pathologie Lewy, tel que le marquage à la Thioflavine-S qui se fixe aux feuillettes β (Recasens et Dehay, 2014).

Effet de la P° de l'α-syn vs WT	Ser87	Tyr125	Ser129	Tyr133	Tyr136
Interaction membranes	↘ <i>Paleologou et al., 2010 : <u>CK1</u></i>	?	↘ <i>Fujiwara et al., 2002 : <u>CK2</u></i> = <i>Paleologou et al., 2008 : <u>CK1</u></i>	?	?
Agrégation	X <i>Paleologou et al., 2010 : <u>CK1</u></i>	↘ oligomères <i>Chen et al., 2009 : <u>Shark</u></i> (homologue de <u>Syk</u> chez la <u>drosophile</u>)	↗ <i>Fujiwara et al., 2002 ; Smith et al., 2005 : <u>CK2</u></i> ↘ <i>Paleologou et al., 2008 : <u>CK1</u></i> ↗ oligomères + mort neuronale <i>Chen et Feany., 2005 : <u>GRK2</u></i> ↘ <i>Oueslati et al., 2013 : <u>PLK2</u></i>	Pas d'effet connu sur l'agrégation <i>Zangh et al., 2019</i>	Pas d'effet connu sur l'agrégation <i>Zangh et al., 2019</i>
Localisation cellulaire	?	?	+ noyau <i>Mbefo et al., 2010 : <u>PLK2 + 3</u></i>	?	?

Tableau 4. Sites de phosphorylation de l'α-syn et leurs effets sur l'interaction de l'α-syn avec la membrane, son agrégation et sa localisation cellulaire. ↘ *diminue* ; ↗ *augmente* ; = *pareil comparé à l'α-syn WT*. X, *empêche*. Kinase impliquée. CK, *caséine kinase* ; GRK, *récepteur kinase couplé aux protéines G* ; P°, *phosphorylation* ; PLK, *polo-like kinase* ; WT, *wild-type*.

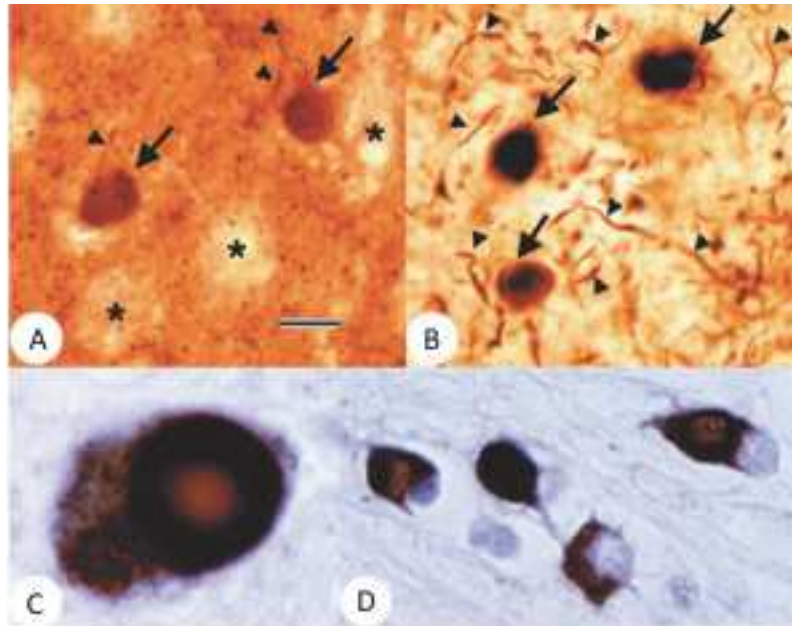


Figure 8. Immunohistochimies montrant des CL dans différentes synucléinopathies. Marquage de CL dans le néocortex temporal d'un cerveau de patient MCL, par un anticorps dirigé contre l' α -syn humaine (A) ou l' α -syn pS129 (B). Les flèches et têtes de flèches indiquent les CL et les NL respectivement. Marquage de l' α -syn pS129 montrant des CL dans le tronc cérébral d'un patient atteint de MP (C) ou dans la glie de la région du pont d'un patient atteint d'AMS (D). AMS, *atrophie multisystématisée* ; CL, *corps de Lewy* ; MCL, *maladie à corps de Lewy* ; NL, *neurites de Lewy*. Fujiwara et al., 2002.

b) Agrégation et formes pathologiques de l' α -syn

(1) Agrégation de l' α -syn

L'agrégation de l' α -syn en fibrilles amyloïdes se fait en deux étapes. Le modèle de nucléation-élongation (Figure 9) a pour la première fois été proposé par Jarrett et Lansbury en 1993 pour la maladie à prion et la MA (Jarrett et Lansbury, 1993).

- Phase 1 : la **nucléation**. (Figure 9, N)

Durant cette phase, il y a formation d'un noyau d'agrégation, aussi appelé noyau amyloïdogénique (ou « seed » en anglais), à partir de monomères d' α -syn solubles. La première étape consiste en un changement de conformation du monomère d' α -syn non replié en un intermédiaire partiellement replié (Figure 9, I) et susceptible de s'agréger. Cet intermédiaire possède donc une partie non repliée et une partie en feuillets β (Uversky et al.,

2001). Cet intermédiaire participe ensuite à la formation d'un oligomère enrichi en feuillets β qui peut former le noyau amyloïdogénique (Uversky et al., 2001). La phase de formation du noyau est lente car elle contient des changements structuraux importants (« lag phase ») (Jarrett et Lansbury, 1993 ; Uversky et al., 2001 ; Villar-Piqué et al., 2016).

- Phase 2 : l'**élongation**. (Figure 9, F)

Une fois le noyau stable formé, il incorpore des monomères d' α -syn (natifs ou intermédiaires partiellement repliés) (Uversky et al., 2001) pour former des fibrilles amyloïdes. Cette phase de croissance est rapide par l'addition de monomères aux extrémités des fibrilles. La vitesse d'élongation diminue lorsque la quantité de monomères disponibles diminue : c'est la saturation (Invernizzi et al., 2012 ; Buell, 2017).

In vivo, des fibrilles ou des précurseurs de fibrilles peuvent se fragmenter afin de générer de nouveaux noyaux pour propager la réaction. En effet, une caractéristique de ce modèle de nucléation est que des noyaux préformés permettent d'accélérer ce processus d'agrégation en recrutant les protéines solubles pour générer de nouvelles fibrilles (Jarrett et Lansbury, 1993 ; Soto et Pritzkow, 2018). Les fibrilles sont également capables d'initier ce qu'on appelle une nucléation secondaire, c'est à dire qu'au contact de ces fibrilles, les protéines normales sous forme de monomères changent de conformation pour former de nouveaux oligomères, et ainsi accélérer le processus d'agrégation (Buell et al., 2014 ; Gaspar et al., 2017). Le processus de nucléation secondaire augmente donc à la fois le nombre d'oligomères et le nombre de fibrilles (Buell et al., 2014).

Il existe d'autres voies d'agrégation qui peuvent donner d'autres variants que les fibrilles amyloïdes, tels que les oligomères solubles et les agrégats amorphes. Ces voies sont influencées par des facteurs différents (Fink, 2006). D'un point de vue morphologique, les agrégats amorphes sont désordonnés alors que les amyloïdes sont hautement ordonnés (Invernizzi et al., 2012).

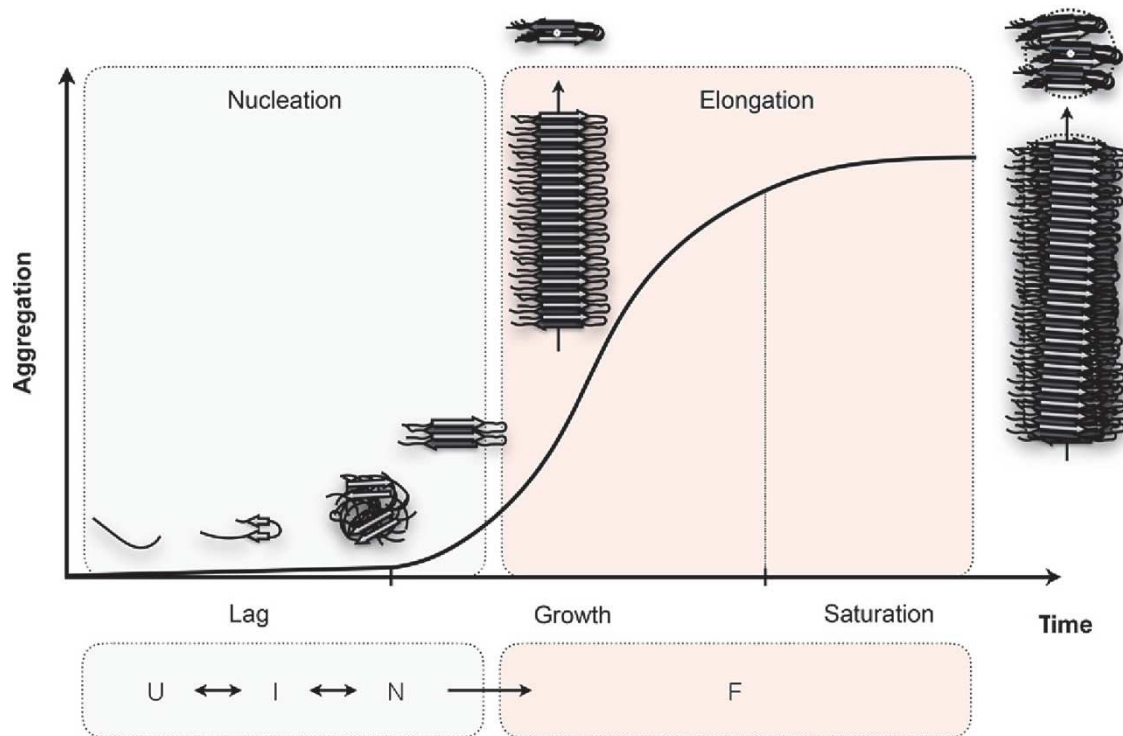


Figure 9. L'agrégation de l' α -syn est caractérisée par une réaction de polymérisation dépendante d'une phase de nucléation. Les mécanismes de formation de fibrilles amyloïdes d' α -syn obéissent à un modèle de nucléation en deux étapes. La première est l'étape de **nucléation** qui débute par un auto assemblage de monomères non repliés d' α -syn (**U**) suivi de la conversion d'intermédiaires (**I**) en noyau stable favorable à l'agrégation (**N**). Cette première étape est l'étape limitante de l'agrégation de l' α -syn. Elle est suivie d'une phase rapide d'**élongation** par addition d' α -syn soluble aux extrémités libres des protofibrilles (**F**). Durant l'élongation, la nucléation continue. De plus la fragmentation de fibrilles génère de nouveaux « noyaux » qui vont favoriser l'intégration des monomères d' α -syn. L'auto-assemblage en fibrilles va continuer rapidement jusqu'à ce que le pool total de monomères libres soit épuisé, ce qui se traduit par un plateau. Cette courbe sigmoïdale représente les cinétiques de l'agrégation de l' α -syn *in vitro*. Peelaerts et Outeiro, 2017.

(2) Conformations pathologiques de l' α -syn

Lorsqu'on parle des protéines et de leurs conformations physiologiques ou pathologiques on utilise les termes « monomères », « oligomères » et « fibrilles ». Ces termes génériques permettent en fait de rassembler sous un même terme, différents sous types structuraux. On ne sait toujours pas à ce jour comment ces différentes assemblées protéiques se forment *in vivo*, lesquelles sont associées aux pathologies humaines et comment elles y contribuent

(Peelaerts et al., 2018), mais les formes pathologiques prédominantes semblent être les oligomères et les fibrilles.

(a) Oligomères

Les oligomères constituent une espèce soluble, hétérogène, instable et transitoire. Ils sont donc mal définis (Villar-Piqué, 2016). Selon les différents protocoles de préparation et de purification, on observe des oligomères de différentes tailles et morphologies (sphéroïdale, ellipsoïdale, circulaire, tubulaire, plate) (Conway et al., 2000 ; Lashuel et al., 2002 ; Cremades et al., 2012 ; Bousset et al., 2013). La plus petite association de chaînes polypeptidiques en oligomère est un dimère, mais il peut être composé de centaines de chaînes. On obtient alors de larges oligomères comme par exemple les protofilaments et les protofibrilles (Soto et Pritzkow, 2018).

La structure secondaire des oligomères est également variable. En effet, les oligomères ne sont pas complètement repliés et la majeure partie de leur structure secondaire peut être soit en hélices α soit en feuillets β , avec plus ou moins de régions hydrophobes exposées (Cremades et al., 2017). Il est suspecté que leur structure passe d'hélices α à feuillets β lors de l'agrégation (Ghosh et al., 2015). Toutefois, la structure secondaire oligomérique de l' α -syn la plus observée serait celle en feuillets β antiparallèles (Ghosh et al., 2015). Les feuillets β sont stabilisés par des ponts hydrogènes ainsi que des interactions hydrophobes. Ils possèdent des terminaisons « collantes » afin de recruter d'autres protéines partiellement ou complètement repliées pour les forcer à changer de conformation et les intégrer dans l'oligomère constitué de feuillets β (Soto et Pritzkow, 2019). L'oligomère pathologique possède donc une structure en feuillets β .

Comme expliqué ci-dessus les oligomères peuvent former un noyau amyloïdogénique, une structure relativement stable, et font partie de la voie « on » (« on-pathway »). D'autres oligomères peuvent rester solubles pour ensuite former ou non ce qu'on appelle des agrégats amorphes. On dit que ces oligomères font partie de la voie « off » (« off-pathway ») car ils ne participent pas à la formation de fibrilles amyloïdes (Uversky et al., 2001 ; Ehrnhoefer et al., 2008 ; Fagerqvist et al., 2013).

Il est important de noter que les expériences permettant d'obtenir ces informations sont réalisées *in vitro* avec des formes d' α -syn recombinante et que les mécanismes

pathologiques ne sont peut-être pas les mêmes que dans le cerveau humain (Villar-Piqué et al., 2016). De plus des oligomères ont été décrits en condition physiologique (Bartels et al., 2011 ; Burré et al., 2014), et il a été décrit que l'association sous forme d'oligomère à la membrane peut prévenir la formation de fibrilles (Burré, 2015).

(b) Fibrilles

Les fibrilles d' α -syn sont observées essentiellement dans les corps de Lewy présents dans les synucléinopathies. On utilise parfois le terme « **amyloïde** » pour parler des fibrilles afin de mettre en avant leur caractéristique de fibre insoluble et résistante à la dégradation.

Toutes les fibrilles possèdent une structure commune qui est celle **en feuillets β croisés**, ce qui signifie que chaque brin β est perpendiculaire à l'axe de la fibrille (**Figure 10**) (Fink, 2006). Contrairement aux oligomères, les feuillets β des fibrilles d' α -syn sont parallèles et non antiparallèles (Celej et al., 2012).

Il existe également différentes morphologies de fibrilles (entortillées, courbées, droites) avec un diamètre allant de 6nm à 18nm et une longueur de 0,1 μ m à plus de 5 μ m (van Raaij et al., 2008 ; Sweers et al., 2011, 2012 ; Bousset et al., 2013). Ces variants structurels, aussi appelés « souche » (« strain »), pourraient être à l'origine des différences observées entre les synucléinopathies (Melki, 2015 ; Peelaerts et al., 2015 ; Alam et al., 2019). En effet, des études ont montrés que des injections d'homogénats cérébraux de patients atteints de MP ou d'AMS dans le cerveau de souris et/ou de primate non humain entraînaient des déficits et une pathologie similaires à chacune des maladies respectivement (Watts et al., 2013 ; Recasens et al., 2014) (voir « Modèles par injection d' α -syn endogène », p. 53). Deux souches majeures ont été identifiés et étudiées : les « ribbons » et les fibrilles (Bousset et al., 2013 ; Peelaerts et al., 2015 ; Rey et al., 2019). Il a été montré que ces souches n'induisaient pas la pathologie de la même manière. Par exemple, *in vivo* les inclusions d' α -syn pS129 sont plus nombreuses après les injections dans la SN de « ribbons » que de fibrilles, mais les fibrilles induisent plus de toxicité au sein de la



Figure 10. Structure en feuillets β croisés des fibrilles d' α -syn.
Fink, 2006.

voie nigro-striée. L'injection de fibrilles uniquement a pu entraîner un déficit moteur chez les souris. De plus, les « ribbons » sont capables de transmettre la pathologie aux oligodendrocytes, ce qui n'a pas été observé après l'injection des fibrilles (Peelaerts et al., 2015). Plus récemment, une équipe a étudié l'effet d'injections de 5 souches différentes d' α -syn recombinante fibrillaire (fibrilles, « ribbons », fibrilles-65, fibrilles-91, fibrilles-110) dans le BO de souris. Ils ont observé des capacités et des cinétiques différentes dans l'induction (« seeding ») de la pathologie en analysant la densité de la pathologie 3 et 6 mois post-injection (p.i.). Le type de pathologie induite est également différent : alors que certaines souches induisent majoritairement une pathologie de type NL, d'autres induisent également des inclusions somatiques de type CL. Enfin, l'étendue de la propagation en termes de régions affectées est également différente selon les souches (Rey et al., 2019).

(3) Perte de fonction ou gain de fonction toxique ?

La pathologie liée à l' α -syn peut découler d'une **perte de fonction** et/ou d'un **gain de fonction toxique** de la protéine. Il est fort probable que les deux mécanismes soient impliqués dans la pathogénèse des synucléinopathies, même si le gain de fonction toxique est sûrement le plus en cause. En effet, même si l' α -syn semble jouer un rôle important au sein de la transmission synaptique, une déplétion de cette protéine n'a pas d'impact majeur sur le fonctionnement neuronal (Abeliovitch et al., 2000 ; voir « Rôle de l' α -syn au niveau synaptique » p. 27), suggérant qu'elle n'est pas cruciale pour le neurone. Ainsi une perte de fonction de l' α -syn ne pourrait sûrement pas, à elle seule, générer une synucléinopathie.

(4) Toxicité de l' α -syn

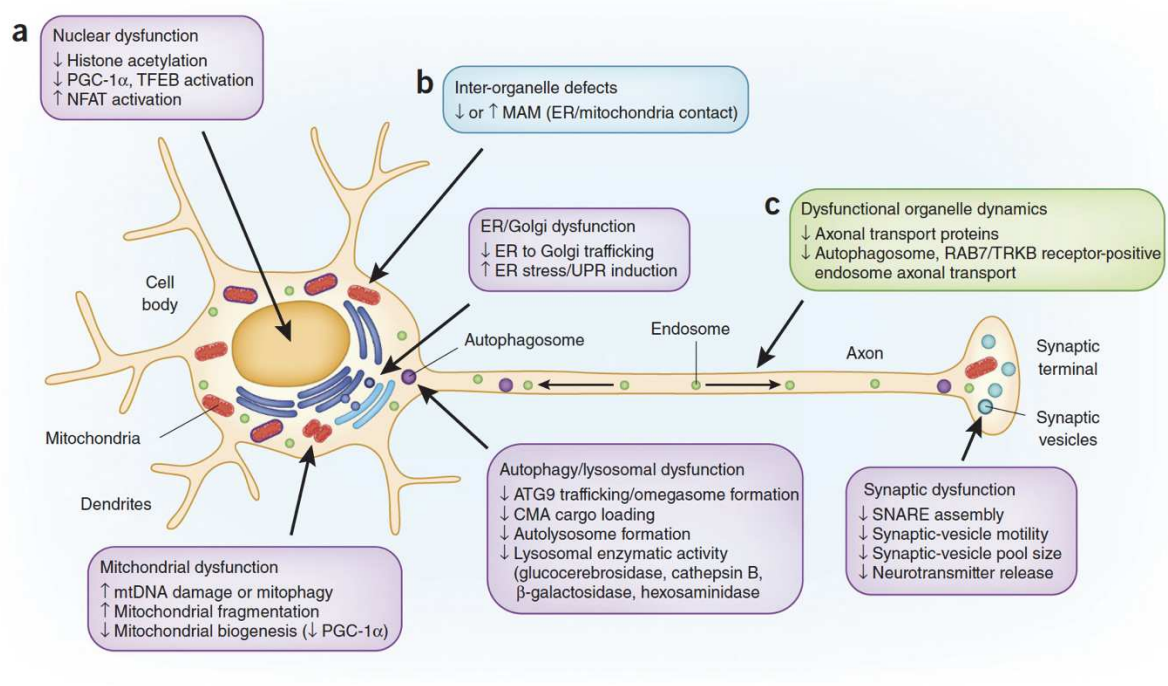
Les oligomères ont longtemps été suggérés comme étant la forme toxique de l' α -syn (Conway et al., 2000 ; Winner et al., 2011 ; Colla et al., 2012 ; Rockenstein et al., 2014) (Roberts et Brown, 2015 ; Ingelsson, 2016). Cependant de nombreuses études soutiennent également un rôle neurotoxique des formes fibrillaires de l' α -syn. En effet, ces études ont décrit une induction et une propagation de la pathologie α -syn dans le cerveau de modèles murins, à partir d'injections de diverses formes fibrillaires d' α -syn dans le cerveau de ces souris (voir « Modèles par injection d' α -syn pathogène », p.53).

Certaines études soutiennent l'hypothèse que la formation d'agrégats d' α -syn, à savoir les corps de Lewy présents dans les synucléinopathies, pourrait être neuroprotectrice. Ces agrégats intègreraient les formes toxiques d' α -syn afin qu'elles ne puissent plus exercer leur toxicité cellulaire (Olanow et al., 2004 ; Tanaka et al., 2004 ; Bodner et al., 2010). D'autre part on peut également voir ces agrégats comme un réservoir qui pourrait libérer des oligomères toxiques (Winklhofer et al., 2008).

Selon la littérature on observerait donc un effet pathologique à la fois des oligomères et des fibrilles, et cela de manière variée et à **différents niveaux subcellulaires (Figure 11)** (pour revue : Villar-Piqué et al., 2016) :

- La **perméabilisation des membranes** (cytoplasmique, vésiculaire, mitochondriale), entraînant globalement une perte d'homéostasie cellulaire
- L'**altération du cytosquelette** et plus particulièrement des microtubules, et donc du transport axonal
- Le **dysfonctionnement du réticulum endoplasmique**, affectant le trafic avec le Golgi ainsi que la fragmentation de ce dernier
- L'**altération des mécanismes de dégradation protéique** à savoir le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie lysosomale, aggravant dans un cercle vicieux l'accumulation de protéines mal conformées
- L'**altération de la fonction mitochondriale**, plus particulièrement par le dysfonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire, induisant du stress oxydatif

Ces multiples cibles altèrent le fonctionnement neuronal, et entraînent finalement la NDG. Elles sont globalement les mêmes pour les oligomères et les fibrilles. Cependant, les fibrilles possèdent une caractéristique pathologique spécifique qui est leur capacité à propager la pathologie α -syn en formant de nouveaux noyaux amyloïdogéniques. Elles joueraient donc un rôle central dans la dispersion de la pathologie, mais les oligomères seraient les initiateurs de l'effondrement de l'homéostasie neuronale (Alam et al., 2019).



Kim Caesar/Springer Nature

Figure 11. Voies impliquées dans la toxicité de l' α -syn. Dysfonctionnement des organelles en violet (a), des contacts inter-organelles en bleu (b), et de la dynamique des organelles en vert (c). Wong et Krainc, 2017.

c) L' α -syn et l'hypothèse prion

(1) *La naissance de l'hypothèse*

En 2003, Braak propose un modèle d'évaluation de la sévérité de la pathologie Lewy en 6 stades au sein du cerveau de patients atteints de MP (Braak et al., 2003b). A partir de régions cérébrales privilégiées, on peut observer une évolution de la pathologie selon une séquence topographique prévisible. Les régions cérébrales atteintes au fur et à mesure sont interconnectées : la pathologie commencerait dans le système nerveux entérique, puis est observée dans le tronc cérébral, avant de s'accumuler dans le mésencéphale et plus particulièrement la SN. Dans les stades plus avancés de la MP, la pathologie est observée dans d'autres structures telles que le thalamus ou certaines régions néocorticales. Ces observations amènent Braak à suggérer que la pathologie Lewy pourrait se propager au sein du système nerveux central, à partir du système nerveux périphérique *via* le nerf vague, par transport axonal rétrograde et transmission trans-neuronale (Braak et al., 2003b).

Par la suite, une découverte est venue appuyer cette hypothèse. Un patient atteint de MP bénéficie d'une greffe de neurones embryonnaires mésencéphaliques dans le Str. Quatorze ans plus tard, des inclusions de type CL sont observées dans le greffon, indiquant que la pathologie Lewy présente dans les neurones malades s'était transmise aux neurones sains greffés (Kordower et al., 2008 ; Li et al., 2008). Kordower suggère que les neurones dopaminergiques sont sensibles soit à un facteur cérébral particulier, soit à un processus pathologique capable de se transmettre de cellule en cellule (Kordower et al., 2008). De son côté, Li suggère que l' α -syn pathogène se propage de manière prion à partir des cellules hôtes vers celles du greffon (Li et al., 2008, 2010). Les travaux réalisés par Desplats et collaborateurs

soutiennent cette hypothèse en montrant que : *in vitro* l' α -syn est transférée par endocytose aux neurones voisins et y forme des inclusions de type CL ; *in vivo* l' α -syn est transférée à partir de neurones de l'hôte à des précurseurs neuronaux greffés dans un modèle murin de synucléinopathie (Desplats et al., 2009).

(2) La pathologie et la propagation de type prion

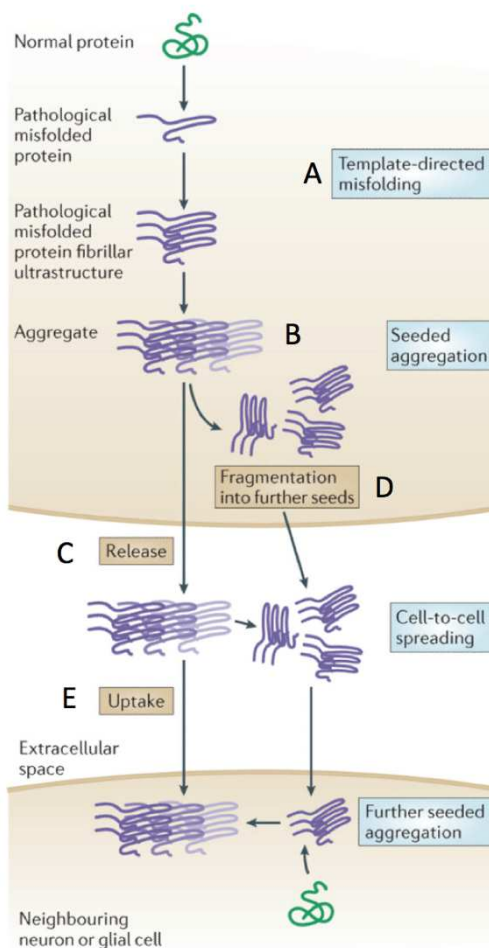


Figure 12. Mécanismes hypothétiques de la propagation type prion des protéines dans les maladies neurodégénératives.

Brettschneider et al., 2015

L'hypothèse de propagation type prion a été suggérée pour l' α -syn mais également pour d'autres protéinopathies telles que A β , tau ou TDP43 (Brettschneider et al., 2015). En effet, il est suggéré que l'évolution de certaines maladies NDG comme la MP ou la MA suivent ce modèle. Celui-ci suggère qu'une protéine dans une conformation secondaire pathologique induise un changement de conformation de la protéine dite « normale » en conformation pathologique, en servant de modèle (« template »), à la manière d'une protéine prion (**Figure 12A**). Suite au changement de conformation, la protéine va s'agréger avec d'autres protéines

pathologiques dont elle a induit le changement de conformation (**Figure 12B**). L'agrégat peut être libéré dans l'espace extracellulaire (**Figure 12C**) ou bien d'abord être fragmenté en plusieurs parties appelées « seeds » (**Figure 12D**). Une fois dans l'espace extracellulaire, les formes pathologiques peuvent être capturées par une cellule voisine (**Figure 12E**), dans laquelle elles transmettent la pathologie à des protéines saines, et propagent ainsi la pathologie.

De nombreux modèles ont été générés suite à ces découvertes afin de modéliser la propagation de l' α -syn par injection de formes fibrillaires pathologiques, qui peuvent être soit recombinantes, soit extraites de cerveaux de patients ou de modèles rongeurs de synucléinopathies. Ces modèles appuient l'hypothèse de la propagation de type prion de l' α -syn en transmettant et propageant la pathologie au sein du système nerveux, et dans certains cas en induisant des troubles neurologiques associés (voir « Modèles par injection d' α -syn pathogène », p.53).

(3) *Les voies de propagation de l' α -syn*

Les voies de propagation des formes pathologiques de l' α -syn peuvent être multiples. Ces voies comprennent plusieurs étapes, à savoir la propagation intracellulaire, la libération extracellulaire et/ou le trafic intercellulaire (neurones et glies), et la capture par des cellules voisines (pour revues : Lashuel et al., 2013 ; Wales et al., 2013 ; Peelaerts et al., 2018).

L' α -syn (monomères, oligomères, fibrilles) peut être libérée de manière passive, c'est à dire lors de la mort cellulaire d'un neurone (**Figure 13A**), ou bien de manière active c'est à dire par sécrétion. La sécrétion de l' α -syn peut être faite par voie conventionnelle via des exosomes (**Figure 13B**), ou par voie non conventionnelle (**Figure 13C**) (transporteur membranaire, microvésicules à proximité de la membrane). Elle peut ensuite entrer dans des cellules voisines (neurones ou glie) *via* pénétration directe (**Figure 13D**) si la membrane est perméabilisée (pores membranaires par exemple), *via* des récepteurs membranaires, ou en utilisant le système d'internalisation cellulaire c'est à dire l'endocytose (**Figure 13E**). L' α -syn peut également être transmise par des interactions directes entre les neurones à savoir la transmission trans-synaptique (**Figure 13F**), ou les nanotubes à effet tunnel (« tunneling

nanotubes ») (**Figure 13G**) qui forment une connexion directe entre le cytoplasme de deux cellules et permettent les échanges de contenu.

De plus, un autre contributeur à cette propagation serait la vulnérabilité sélective de sous populations cellulaires. En effet, certains types neuronaux ou gliaux pourraient avoir des moyens de clairance plus efficace que d'autres et seraient alors moins ou non permissifs à la pathologie (Peelaerts et al., 2018).

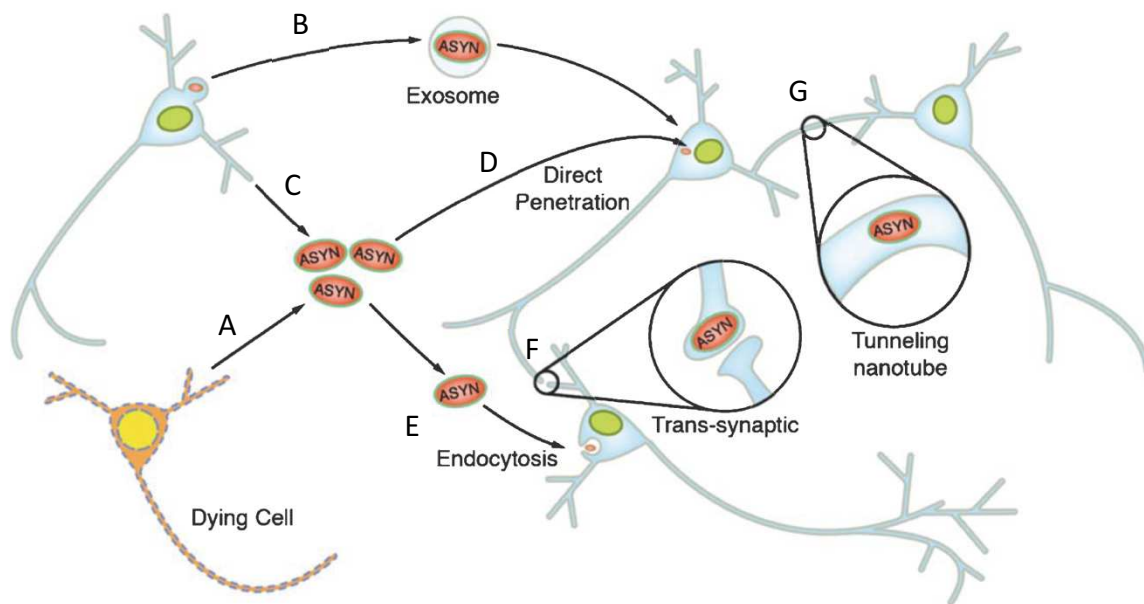


Figure 13. Voies de propagation intercellulaire de l' α -syn. Différentes espèces d' α -syn (monomères, oligomères, fibrilles) peuvent être libérées de manière passive (**A**) ou active dans l'espace extracellulaire. La sécrétion active peut se faire *via* une voie d'exocytose conventionnelle, les exosomes (**B**), ou non conventionnelle (**C**). L' α -syn peut entrer dans d'autres neurones par pénétration directe (**D**), par endocytose (**E**), ou encore *via* des récepteurs membranaires (non représenté). Les deux autres mécanismes de propagation impliquent des interactions directes entre le neurone donneur et le neurone cible, et peuvent se produire par transmission trans-synaptique (**F**) ou par des nanotubes à effet tunnel (« tunneling nanotube ») (**G**). D'après Wales et al., 2013.

d) Modèles murins d'expression de l' α -syn

(1) *Les modèles animaux*

Un modèle animal induit est souvent généré dans le but de reproduire une maladie décrite chez l'Homme – bien qu'il existe des modèles non pathologiques permettant d'étudier des processus physiologiques. Cette tentative de reproduction est généralement moins complexe que la réalité, dans laquelle de nombreux facteurs souvent méconnus s'associent. Les modèles sont conçus afin d'améliorer la compréhension de processus qui sont au cœur de pathologies observées chez l'Homme, d'identifier de nouveaux biomarqueurs permettant d'améliorer les diagnostics et *in fine* de tester diverses formes de thérapies.

(a) *Les critères de validité d'un modèle*

Globalement un modèle doit répondre à certains critères. Tout d'abord, il doit remplir les critères de validités internes (randomisation, évaluation à l'aveugle, statistiques, taille des échantillons, bien-être animal, sexe et fond génétique) qui sont nécessaires à toute bonne analyse scientifique (Jucker, 2010). De plus, un modèle animal est décrit comme valide s'il ressemble à la pathologie humaine en termes d'étiologie, de pathophysiologie, de symptomatologie et en termes de réponses thérapeutiques (Varga et al., 2010). De ce fait on observe trois critères de validités majeures : l'homologie ou la validité théorique, l'isomorphisme ou la validité d'aspect, la prédictivité ou la validité prédictive (Dam et Deyn, 2006 ; Dawson et al., 2018). Ces critères ont été établis pour la première fois en 1969 pour des modèles animaux de dépression (McKinney et Bunney, 1969).

- L'**homologie** (aussi appelée validité théorique, ou encore « construct validity ») : est-ce que les mécanismes mis en jeu pour induire le phénotype chez le modèle reflètent ceux mis en jeu dans ce qu'on essaye de reproduire ? En d'autres termes, dans le cas d'une pathologie par exemple, est-ce que le modèle reflète l'**étiologie** de la condition étudiée chez l'Homme ?
- L'**isomorphisme** (aussi appelé validité d'aspect, ou « face validity ») décrit la similitude phénoménologique, c'est à dire phénotypique. Est-ce que le modèle réplique les **symptômes** présents dans la condition humaine ?
- La **prédictivité** (aussi appelée validité prédictive, ou « predictive validity ») : est-ce que le modèle permet de prédire la réalité clinique ? en d'autres termes prédire ce qui

n'est pas encore connu chez l'Homme. Ce critère est parfois utilisé pour parler de l'isomorphisme pharmacologique, c'est à dire la capacité du modèle à identifier des composants avec des effets potentiellement thérapeutiques chez l'Homme, et dans l'autre sens est-ce que des traitements qui fonctionnent chez l'Homme fonctionneraient chez le modèle.

(b) Limites des modèles animaux

Une des limites des modèles est que très souvent l'étiologie d'une pathologie chez l'Homme n'est pas connue. La plupart des modèles répliquent d'ailleurs des formes génétiques des pathologie, alors que la majorité des maladies neurodégénératives est sporadique. Les formes familiales ne possèdent pas tout à fait le même phénotype que les formes sporadiques, cependant elles constituent un excellent substitut pour la validité des modèles transgéniques. Grâce aux modèles transgéniques, il a été possible d'étudier des mécanismes biologiques et d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques. Cependant du fait qu'un modèle ne puisse pas reproduire complètement le phénotype humain, et que même dans un mécanisme complexe on ne peut pas être sûr que toutes les étapes sont les mêmes que chez l'Homme, le pouvoir prédictif en termes de thérapeutique est faible dans un modèle murin de maladie neurodégénérative (Dawson et al., 2018), nécessitant donc souvent de passer chez un modèle plus proche de l'Homme comme le primate non humain.

Enfin, il est important de garder en tête que l'Homme développe des maladies humaines, et que les souris ne développent pas de maladies humaines (Lutz et Osborne, 2013). De plus lorsqu'on teste des changements de comportement chez le rongeur, même si la composante neuroanatomique qui soutient la fonction testée est identique chez l'Homme, la manifestation des déficits n'est pas la même. Par exemple, l'akinésie (rareté des mouvements) et la bradykinésie (ralentissement des mouvements volontaires) qui sont des manifestations cliniques de la MP, sont testées chez le rongeur grâce au rotarod ou au test de traversée de la barre qui permettent en fait d'évaluer la coordination motrice et l'équilibre (Potashkin et al., 2010).

Finalement, la définition d'un bon modèle est dépendante de ce que l'on veut étudier. Par exemple quelle partie d'une pathologie veut-on reproduire, plutôt la pathologie tau ou

amyloïde de la MA ? Quel stade de la pathologie veut-on étudier, précoce ou tardif ? L'étude du stade prodromal d'une pathologie par exemple serait plus aisée sur un modèle dont la progression de la pathologie n'est pas trop rapide et sévère. Dans le cas des maladies neurodégénératives, aucun modèle ne reproduit exactement le phénotype observé chez l'Homme (Dawson et al., 2018). L'usage de plusieurs modèles est donc nécessaire, chacun apportant des informations spécifiques.

(2) Modèles transgéniques α -syn

Etant donné que l'agrégation de l' α -syn joue très probablement un rôle central dans la pathogénèse des synucléinopathies, de nombreux modèles transgéniques exprimant l' α -syn sous diverses formes et sous divers promoteurs ont été générés. La plupart de ces modèles ont été générés pour modéliser la MP, mais certains modèles pourraient modéliser une pathologie de type MCL. En effet, une caractérisation du phénotype cognitif a révélé la présence de déficits dans certains de ces modèles (pour revue : Hatami et Chesselet, 2015).

Les modèles présentés ici sont ceux qui ont été désignés dans la littérature comme modèles de synucléinopathie type MCL (**Tableau 5**). Celui qui surexprime l' α -syn sous le promoteur PDGF- β (lignée D) est utilisé comme modèle de MCL (Goldberg et al., 2017), et a également servi à générer une souris double transgénique APP/ α -syn citée comme modèle « type MCL » (Mandler et al., 2019). D'autre part, le modèle Le modèle de Zhou et collaborateurs pourrait être un bon modèle de MCL car il récapitule très bien les caractéristiques de la maladie humaine, cependant la mutation utilisée n'est pas une mutation rencontrée chez l'Homme dans la MP ou la MCL (**Tableau 5**).

Tableau 5. Modèles transgéniques exprimant l' α -syn modélisant une pathologie type MCL.

Modèle	Forme α -syn	Promoteur	Pathologie α -syn	Phénotype moteur	Phénotype cognitif	Références
mThy1-α-syn (Lignée 61)	α -syn humaine WT	Thy1 murin	Structures diffuses α -syn pS129 de type inclusions, insolubles au détergent Neurites dystrophiques dans le cerveau	Déficits : coordination motrice (6-12 mois, test de la barre + poteau), mouvements fins et complexes (4 mois, utilisation de coton)	X Ralentissement des oscillations cérébrales, et excitabilité aberrante des réseaux neuronaux	Games et al., 2013 ; Flemming et al., 2004, 2006 ; Morris et al., 2015 ; Rockenstein et al., 2002
PDGFβ-α-syn (Lignée D)	α -syn humaine WT	PDGF- β humain	Inclusions α -syn + ubiquitine, nucléaires et cytoplasmiques dans néocortex, hippocampe, SN	Déficits : coordination motrice (12 mois, rotarod) ⚡ TH striatale, pas de NDG SN	X	Maslah et al., 2000 ; Rockenstein et al., 2002
APP/α-syn (Lignée J9 x lignée D)	α -syn humaine WT (+ APP humaine)	PDGF- β humain	Inclusions α -syn pS129 de type fibrillaire ↗ oligomères α -syn vs non Tg ou simple Tg A β augmente agrégation α -syn + coprécipite + NDG CA3 + <i>dégénérescence terminaisons synaptiques + neurones cholinergiques</i>	Déficits : Coordination motrice (6 mois, rotarod)	Déficits : Apprentissage et mémoire spatiale (6 mois, piscine de Morris)	Cartier et al., 2014 ; Maslah et al., 2000, 2001 ; Tsigelny et al., 2008
mThy1-Y39Cα-syn	α -syn humaine Y39C	Thy1 murin	Accumulation oligomères α -syn à partir de 15 mois Type CL surtout dans cortex à 24 mois : α -syn pS129 + ubiquitine NDG à partir de 21 mois	Déficits : Coordination motrice (rotarod, 9 mois < 24 mois) Pas de NDG neurones dopaminergiques	Déficits : Apprentissage et mémoire spatiale (piscine de Morris, 15 mois < 24 mois)	Zhou et al., 2008
tetP-WTα-syn x CAMKIIα-tTA (Lignée 7) tetP-A53Tα-syn x CAMKIIα-tTA (Lignée 9)	α -syn humaine WT et A53T Expression conditionnelle, système « tet-off » : la doxycycline empêche l'expression du transgène	Tétracycline CAMKII α	Lignée 9 , 4 mois : Marquage α -syn, +++ dans régions limbiques, plus dense à 8 mois (néocorticale absente) → distribution « limbique prédominante » similaire à MCL/DP 20-22 mois : Accumulation cytoplasmique α -syn diffuse dans le néocortex et l'hippocampe, cortex cingulaire et entorhinal + NDG sévère corticale et hippocampique α -Syn pS129 pour une partie des agrégats + ubiquitine + Thioflavine S Lignée 7 , 8 mois : pathologie moins sévère que lignée 9 mais régions similaires, sauf hippocampe + pas NDG	X	Déficits lignée 9 : Conditionnement de peur au contexte, 8 mois (dépendant de l'hippocampe)	Lim et al., 2010, 2011

APP, « amyloid precursor protein » ; CL, corps de Lewy ; DP, démence parkinsonienne ; MCL, maladie à corps de Lewy ; NDG, neurodégénérescence ; SN, substance noire ; Tg, transgénique ; TH, tyrosine hydroxylase.

(3) Modèles par injection d' α -syn pathogène

De nombreux modèles se sont basés sur la propagation type prion de l' α -syn de manière prion pour générer des modèles de synucléinopathies. Pour cela des injections d' α -syn pathologique dans diverses structures cérébrales ont été réalisées. Les formes pathologiques peuvent être des fibrilles d' α -syn recombinante, humaine ou murine, WT ou mutée, ou bien des homogénats de cerveaux provenant soit de patients atteints de diverses synucléinopathies, soit de modèles murins à des stades pathologiques. La propagation de la pathologie α -syn diffère selon la localisation de l'injection (**Tableau 6**). De ce fait, de nombreux chercheurs ont réalisé les injections dans les structures typiquement impliquées aux stades précoces de la MP, à savoir le Str, la SN ou encore les bulbes olfactifs (BO) (**Tableau 6**).

Tableau 6. Modèles murins de synucléinopathies basés sur la propagation de l' α -syn.

Inoculum	Animal	Site d'injection	Pathologie α -syn	Phénotype moteur & lié	Phénotype cognitif & autre	Références
Homogénat cérébral (TC+ME) de souris Tg M83 (hA53T α -syn) symptomatique (>12 mois)	Souris Tg M83 (C57BL/C3H hA53T α -syn, mâles) asymptomatiques (2-5 mois)	Cx somatosensoriel + Str dorsal Unilatérale	α -syn pS129, insoluble, étendue et bilatérale 90 jours p.i. (BO à ME) + accélère l'accumulation d' α -syn des souris transgéniques	Apparition plus précoce de la paralysie (caractéristique des souris M83 âgées) + réduction de leur durée de vie	X	(Luk et al., 2012b)
Fibrilles préformées d'h α -syn recombinante WT, partie Ct tronquée ou entière	Souris Tg M83 (C57BL/C3H hA53T α -syn, mâles) asymptomatiques (2-5 mois)	Cx somatosensoriel + Str dorsal Unilatérale	α -syn pS129, insoluble, étendue et bilatérale 90 jours p.i. (BO à ME) + accélère l'accumulation d' α -syn des souris transgéniques	Apparition plus précoce de la paralysie (caractéristique des souris M83 âgées) + réduction de leur durée de vie	X	(Luk et al., 2012b)*
Homogénat cérébral de souris Tg M83 (hA53T α -syn) symptomatique (âgées)	Souris Tg M83 (C57BL/C3H hA53T α -syn, sexe non spécifié) asymptomatiques (jeunes)	Non précisé	α -syn pS129 insoluble, 97 jours p.i. Inclusions présentes dans le soma de manière diffuse + neurites dystrophiques	Apparition plus précoce de la paralysie (caractéristique des souris M83 âgées) + réduction de leur durée de vie	X	(Mougenot et al., 2012)
Fibrilles préformées d' α -syn murine recombinante	Souris WT (C57BL6/C3H, sexe non spécifié)	Str Unilatérale	α -syn pS129 Type CL/NL colocalisant avec marqueurs typiques des CL (Thioflavine S et ubiquitine) Propagation progressive dans régions interconnectées. 30 jours p.i. : inclusions α -syn pS129 type CL exclusivement unilatérales, sauf amygdale (avec laquelle Str connecté bilatéralement)	Atteinte de la coordination motrice + perte progressive des neurones dopaminergiques de la SNc	X	(Luk et al., 2012a)

Fibrilles préformées d' α -syn recombinante humaine et murine	Souris WT (C57BL/6J, femelles)	SN Unilatérale	α -syn pS129, 90 jours p.i., étendue et bilatérale 15 mois p.i. Type CL/NL (ubiquitine et p62)	Non, ni perte de neurones dopaminergiques SN 6 et 15 mois p.i.	Non	(Masuda-Suzukake et al., 2013) **
Fraction α -syn sarkosyl-insoluble de cerveaux MCL	Souris WT (C57BL/6J, femelles)	SN Unilatérale	α -syn pS129, étendue 15 mois p.i. Type NL (un peu type CL) Inclusions p62 positives (certaines souris)	X	X	(Masuda-Suzukake et al., 2013) **
Fibrilles préformées d' α -syn AA 21-140 recombinante (AA 0-20 tronqués)	Souris Tg M20 (BL6C3HF1 α -syn, promoteur prion murin, sexe non spécifié)	Injection néonatale, latérale aux ventricules latéraux Bilatérale	α -syn pS129 + p62, étendue 2 μ g inoculum : faible 8 mois p.i. 25 μ g inoculum : faible 1-4mois p.i. abondant 8 mois p.i.	X	X	Sacino et al., 2013 (Sacino et al., 2013)***
Homogénats cerveaux AMS	Souris Tg M83 hétérozygotes (pas de pathologie) (C57/C3H, mâles et femelles)	Lobe pariétal droit Unilatérale	α -syn pS129, sensible à la protéinase-K Etendue 100 jours p.i. Inclusions abondantes α -syn dans oligodendrocytes	Ataxie et locomotion circulaire	X	(Watts et al., 2013)
Fibrilles préformées d' α -syn AA 21-140 recombinante (AA 0-20 tronqués)	Souris Tg M20 (C57BL/C3H, α -syn, promoteur prion murin, mâles et femelles)	Hippocampe Bilatérale	α -syn pS129 Etendue 4 mois p.i. (2 μ g inoculum) Prédominante dans Cx entorhinal	X	X	(Sacino et al., 2014)
CL provenant de la SN de patients MP	Souris WT (C57BL/6, sexe non spécifié)	SN ou Str Bilatérale	α -syn pS129 Accumulation diffuse d' α -syn dans neurones de la SN et régions interconnectées +	4 mois p.i. : Déficits « pole test » 17 mois p.i. : Pas de gros déficit moteur supplémentaire	Non	(Recasens et al., 2014)

			NDG nigrostriatale (commençant par terminaisons dopaminergiques striatales)	NDG des terminaisons axonales DA dans le Str, puis des corps cellulaires de la SNc (4 mois p.i. pour certaines souris puis 17 mois p.i. toutes les souris)		
Fibrilles préformées d' α -syn recombinante A53T	Souris WT (C57BL/6, mâles)	Hippocampe Bilatérale	α -syn pS129 + p62 Type CL/NL NDG hippocampique Induction expression $A_{2A}R$ dans neurones α -syn pS129 positifs + glie hippocampique	2 mois p.i.: non	2 mois p.i.: mémoire de travail (Y-Maze)	(Hu et al., 2016)
Fibrilles préformées d' α -syn recombinante	Souris WT (C57BL6/C3H, mâles et femelles)	Str Unilatéral	α -syn pS129, inclusions résistantes protéinase K, Str + SN ipsilatéraux + cortex bilatéral 60 jours p.i.	60 jours p.i. : non (test de la barre, rotarod, « pole test », activité locomotrice)	X	(Karampetsou et al., 2017)
Fibrilles préformées d' α -syn recombinante murine	Souris WT (CD1, mâles)	Hippocampe Bilatérale	α -syn pS129 Pathologie hippocampique massive et dense dans l'amygdale 3 mois p.i., sans perte neuronale	X	2+3 mois p.i. : pas de déficits de mémoire (RNO, LO), ni olfactifs (nourriture enfouie)	(Nouraei et al., 2018)
Fibrilles préformées d' α -syn recombinante humaine et murine	Souris WT (C57BL/6J, femelles)	BO Unilatérale	α -syn pS129 Etendue 12 mois p.i. Inclusions positives à Thioflavine S, ubiquitine, p62 + résistantes protéinase K Propagation moins rapide humaine < murine NDG noyau olfactif antérieur 6 mois p.i.	Pas de déficit moteur majeur (activité locomotrice en open-field)	Déficits olfactifs importants Forme murine : 3 mois p.i. Forme humaine : 12 mois p.i. Pas de trouble de l'anxiété (open-field)	(Rey et al., 2016, 2018)

Fibrilles préformées d' α -syn recombinante humaine et murine	Souris WT (C57BL/6J, mâles et femelles)	Intramusculaire intestinal	α -syn pS129 Noyau moteur dorsal du nerf vague, locus coeruleus (1 mois p.i.) + amygdale, SNc (3 mois p.i.) + hypothalamus, CPF, Str, BO (7 mois p.i.) ↘ marquage NeuN hippocampique	7 mois p.i. Déficits : tests du rotarod, de la force musculaire (pattes avants), « pole » test NDG dopaminergique SNc, ↘ DA striatale, ↘ TH + DAT dans le mésencéphale ventral	7 mois p.i. Déficits : Y-Maze, RNO 24h, MWM apprentissage + mémoire spatiale 24h, évitement passif 24h (mémoire contexte), nesting Labyrinthe en croix surélevé : ↘ temps bras ouvert OF : ↘ temps au centre Nage forcée + suspension par la queue : ↗ temps immobilité	(Kim et al., 2019)
Fibrilles préformées d' α -syn recombinante murine	Souris WT (C57BL/6J, mâles et femelles)	Str, Bilatérale	α -syn pS129 Amygdale et cortex (dont CPF, PrL, S1/S2, M1/M2, Cg, Cl, PRh, Ent)	6 mois p.i. Pas de déficits moteurs NDG neurones dopaminergiques SN	6 mois p.i. Déficits : dominance sociale, conditionnement de peur	(Stoyka et al., 2019)

A_{2A}R, récepteur adénosine A_{2A} ; *AMS*, atrophie multisystématisée ; *BO*, bulbes olfactifs ; *Cg*, cortex cingulaire ; *Cl*, cortex insulaire ; *CL*, corps de Lewy ; *CPF*, cortex préfrontal ; *DA*, dopamine ; *DAT*, transporteur dopamine ; *LO*, reconnaissance de nouvelle localisation d'objet ; *M1/M2*, cortex moteur primaire/secondaire ; *MCL*, maladie à corps de Lewy ; *ME*, moelle épinière ; *MP*, maladie de Parkinson ; *MWM*, « morris water maze » ; *NDG*, neurodégénérescence ; *NeuN*, marqueur neuronal nucléaire ; *NL*, neurites de Lewy ; *OF*, « open field » ; *PrL*, Cx prélimbique ; *RNO*, reconnaissance de nouvel objet ; *S1/S2*, cortex somatosensoriel primaire/secondaire ; *SN*, substance noire ; *SNc*, substance noire compacte ; *Str*, striatum ; *TC*, tronc cérébral ; *TH*, tyrosine hydroxylase

Modèle M83 : surexpression d' α -syn A53T sous le promoteur protéine prion (PrP) murin. Les souris développent des symptômes neurologiques, incluant des troubles posturaux, paralysie, et attaques après environ 12 mois. Le TC et la ME contiennent une pathologie abondante en CL et NL (Luk et al., 2012).

* Première évidence que les fibrilles préformées seules sont suffisantes pour initier et propager la pathologie α -syn *in vivo*

** Première étude qui montre que l'inoculation d'un échantillon cérébral humain chez la souris peut initier la pathologie α -syn.

*** Ce modèle surexprime environ 5 fois le niveau d' α -syn à l'âge adulte mais ne développe pas de phénotype ni de pathologie α -syn. Les fibrilles aminotronquées 21-140 ont la même capacité d'agrégation que la chaîne amino complète.

C. La mémoire

1. Les systèmes de mémoires

La mémoire est considérée comme l'ensemble des processus neuronaux permettant d'enregistrer, conserver et restituer des informations ou des expériences du passé. Dans cet ensemble de processus, on trouve l'**encodage** qui permet dans un premier temps de créer une forme de mémoire labile. La **consolidation**, si elle survient, permet alors de transformer cette mémoire transitoire en une mémoire stable et maintenue dans le temps. On parle alors de **trace mnésique** (Thompson, 2005) ou d'**engramme mnésique** (Semon, 1906) pour l'information consolidée. Le **rappel** permet finalement de récupérer le souvenir.

Le terme « mémoire » englobe en réalité différents systèmes de mémoire, sous tendus par des réseaux neuronaux distincts. Depuis des décennies, la mémoire et ses bases neuronales sont étudiées, des modèles sont établis puis modifiés au fur et à mesure que de nouvelles découvertes sont faites. Une des premières sources d'informations dans ce domaine fut l'analyse des données cognitives de patients atteints de lésions cérébrales spécifiques. Le patient H.M., suivi par les neuropsychologues Suzanne Corkin et Brenda Milner, est le plus connu : en raison de crises d'épilepsie répétées depuis son adolescence qui empirèrent jusqu'à l'empêcher de travailler, il subit alors une ablation bilatérale de la partie médiane des lobes temporaux, comprenant une grande partie de l'hippocampe et de l'amygdale. Après avoir récupéré de l'opération, il souffrait d'amnésie antérograde, c'est à d'une incapacité à former de nouveaux souvenirs, ainsi que d'amnésie rétrograde sur une période de 11 ans. Il présentait cependant une mémoire à court terme ainsi qu'une mémoire de travail normales, sans atteinte du langage, ni de son quotient intellectuel (Rosenzweig, 1998 ; Corkin, 2002 ; Eichenbaum, 2013). C'est ce type d'informations que les neuropsychologues ont pu utiliser pour distinguer différents systèmes de mémoire comme par exemple la **mémoire à long terme** de la **mémoire à court terme**, qui avaient déjà été dissociées par William James en 1890 (Rosenzweig, 1998).

En 1968, Atkinson et Shiffrin proposent un modèle également basé sur la durée de maintien de l'information et qui comporte trois systèmes de mémoire (**Figure 14**). L'information sensorielle détectée entre dans la **mémoire sensorielle** qui contient un registre par sens. Certaines portions de l'information sont alors sélectionnées selon un processus

attentionnel et sont transférées à la **mémoire à court terme**. Dans celle-ci l'information est perdue au bout d'environ 30sec, à moins qu'elle ne soit répétée par le sujet et dans ce cas elle peut être maintenue tout au long de la période où la personne concentre son attention dessus. C'est par exemple ce qui se produit lorsqu'on veut retenir un numéro de téléphone afin d'appeler quelqu'un : on se le répète jusqu'à ce qu'il soit composé puis généralement on l'oublie immédiatement après. Pendant le temps où l'information se trouve en mémoire à court terme, elle est encodée dans la **mémoire à long terme**, et plus une information passe de temps dans la mémoire à court terme plus sa trace sera forte à long terme. Une répétition prolongée de l'information (ainsi que d'autres processus de stockage) permet donc la formation d'une trace mnésique forte dans la mémoire à long terme, où elle peut être maintenue de manière plus ou moins permanente selon la consolidation (Atkinson et Shiffrin, 1968).

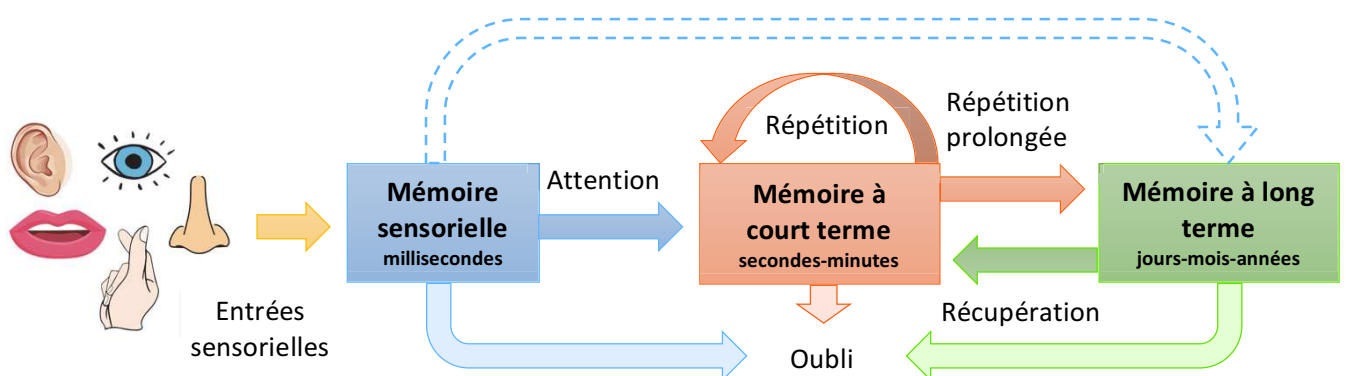


Figure 14. Modèle d'Atkinson et Shiffrin (1971). Les informations sensorielles sont stockées un court instant dans la mémoire sensorielle. L'attention portée sur certains aspects de cette mémoire permet de transférer les informations dans la mémoire à court terme où l'information est alors stockée quelques secondes à plusieurs minutes, à moins que l'information soit répétée et dans ce cas elle est maintenue plus longtemps. Si l'information est pertinente ou fortement répétée elle entre alors en mémoire à long terme où elle est stockée plusieurs jours à années. A partir de là l'information peut être récupérée et repasse en mémoire à court terme. La flèche en pointillés représente le fait qu'au moment de scanner l'information entrante, le registre sensoriel la confronte à la mémoire à long terme afin d'identifier le stimulus par son nom par exemple. De ce fait, l'information entrante dans la mémoire à court terme provient souvent indirectement du système sensoriel et directement de la mémoire à long terme. Adapté d'Atkinson et Shiffrin, 1971.

Le modèle a été critiqué du fait d'avoir intégré le registre sensoriel dans les systèmes de mémoire. Atkinson et Shiffrin l'ont par la suite modifié en affirmant qu'il y avait deux composantes à la mémoire, à savoir mémoire à court et long terme (Atkinson et Shiffrin, 1971). De plus, bien que souvent considérées comme identiques, la mémoire à court terme et la **mémoire de travail** peuvent être distinguées l'une de l'autre. La mémoire de travail permettrait en effet de manipuler l'information maintenue (exemple du calcul mental), alors que la mémoire à court terme permet uniquement de stocker l'information de manière temporaire (Diamond, 2013).

2. Mémoire à long terme et ses sous systèmes

La mémoire à long terme peut être subdivisée en **mémoire à long terme récente** pour décrire un souvenir datant d'une heure à plusieurs semaines voire mois, et en **mémoire à long terme ancienne** afin de qualifier un souvenir vieux d'un an à plusieurs décennies (Rich, 2011).

Il est possible de classer les différents sous-systèmes de mémoire grâce à d'autres critères que celui du décours temporel. Par exemple, en 1965 l'étude du patient H.M. a permis de dissocier la **mémoire déclarative, explicite**, de la **mémoire non déclarative, implicite**. Corkin et Milner ont observé que le patient était capable d'apprendre une tâche sensorimotrice et de s'en souvenir un an plus tard (mémoire non déclarative) bien qu'il ne se souvienne pas d'avoir réalisé la tâche le lendemain lorsqu'on le lui demande (mémoire déclarative) (Rosenzweig, 1998 ; Corkin, 2002 ; Eichenbaum, 2013). Selon McKee et Squire, la distinction majeure au sein du système de mémoire est celle entre la mémoire permettant le rappel conscient d'évènements passés, et les formes variées de mémoire non consciente supportant l'apprentissage de compétences et d'habitudes, le conditionnement classique simple et le phénomène d'amorçage (**Figure 15**) (McKee et Squire, 1993 ; Squire et al., 1993).

a) La mémoire déclarative

La mémoire déclarative, ou explicite, est comme son nom le suggère, une mémoire qu'on peut verbaliser, qu'on peut expliciter. Elle est accessible au rappel conscient et contient des informations apprises ou des évènements vécus. Au sein de cette mémoire, Tulving fait une distinction entre la **mémoire sémantique** et la **mémoire épisodique** (**Figure 15**) (Tulving, 1972). Cette distinction est appuyée par les observations des capacités cognitives du patient

K.C. qui, suite à un accident de la circulation, ne pouvait plus se rappeler d'évènements personnels de son passé mais avait conservé toutes ses connaissances générales (Rosenzweig, 1998 ; Tulving, 2002).

(1) *La mémoire sémantique*

La **mémoire sémantique** est celle des connaissances générales d'un individu. Elle contient notamment les mots et leur signification, ce qui en fait une mémoire nécessaire au langage (Tulving, 1972). Elle permet de se rappeler certains concepts et faits qui ne sont pas propres à l'individu, et donc pas inscrits dans un contexte spatio-temporel. Par exemple, je sais que la capitale de l'Espagne est Madrid, mais je ne me souviens pas à quel moment et où j'ai appris cette information.

(2) *La mémoire épisodique*

La **mémoire épisodique** s'oppose à la mémoire sémantique (**Figure 15**) dans le sens où elle est propre à un individu, c'est une mémoire autobiographique. L'individu peut se rappeler un événement de son passé associé à une dimension spatio-temporelle (Tulving, 1972). On dit que la mémoire épisodique est la mémoire du « quoi », « où » et « quand » (Nyberg et al., 1996).

b) La mémoire non déclarative

Comme cela a été mentionné plus haut, la mémoire non déclarative, ou implicite, est une forme de mémoire non consciente, qui s'exprime d'ailleurs par les performances plutôt que par le rappel (**Figure 15**) (Squire et al., 1993).

La mémoire non déclarative comprend notamment la mémoire procédurale qui est la mémoire du savoir-faire et des automatismes. Elle comprend aussi les phénomènes d'amorçage et d'apprentissage perceptuel, de conditionnement classique ainsi que l'apprentissage non associatif (Squire, 2004).

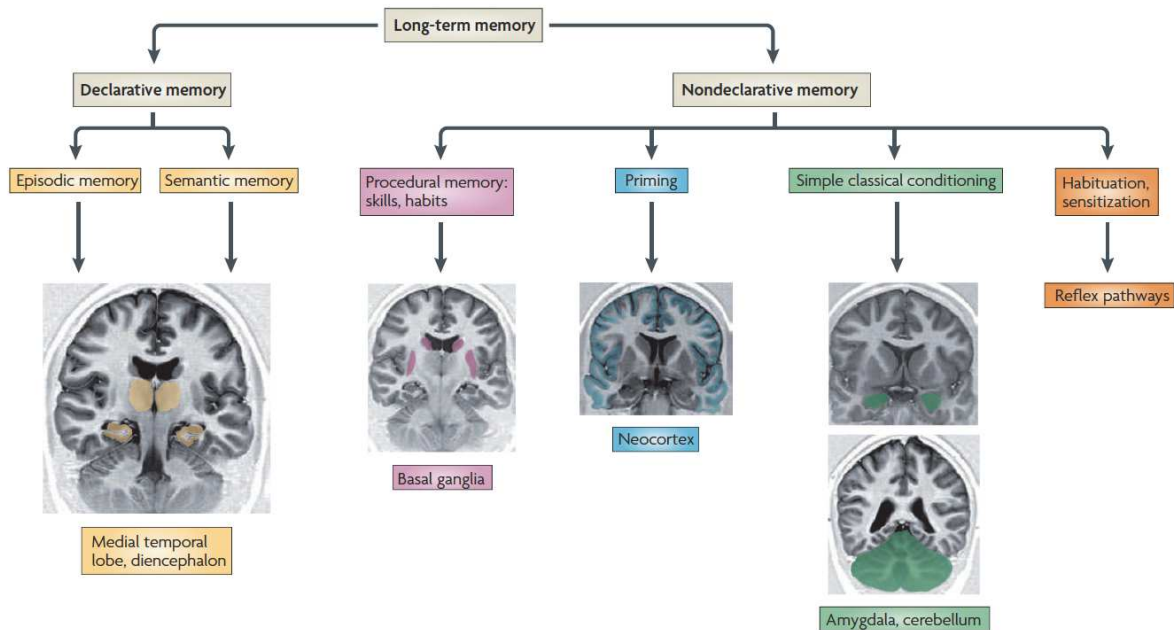


Figure 15. La mémoire déclarative vs non-déclarative. Dans le modèle de Squire et collaborateurs, la mémoire à long terme est séparée entre deux sous-systèmes, eux même divisés en sous-systèmes (Squire et al., 2004). La mémoire déclarative est une mémoire qu'on peut expliciter, dont le rappel est dit conscient, et qui permet le rappel d'évènements et de faits. La mémoire non déclarative est une mémoire dite implicite, et dont le rappel n'est pas conscient et se manifeste par une modification comportementale plutôt que par un souvenir. Elle comprend l'apprentissage procédural de capacités et habitudes sensorimotrices et cognitives, l'amorçage, le conditionnement simple, et l'habituation et la sensibilisation. Ces différents types de mémoires dépendent de différentes structures cérébrales. Henke et al., 2010.

3. La mémoire à l'échelle des réseaux

Chaque système de mémoire à long terme est sous tendu comme décrit précédemment par un ensemble de processus neuronaux appelés : encodage, consolidation, rappel. Mais que signifient ces processus à l'échelle des réseaux cérébraux ?

En 1949, Hebb propose que la mémoire réside dans une assemblée de neurones formée par le renforcement des connexions interneuronales, ce renforcement étant dû à l'**activité synchrone** des neurones durant l'acquisition d'un souvenir (**Figure 16**) (Hebb, 1949).

Les **cellules de l'engramme** sont définies comme étant des neurones activés lors d'une expérience, qui subissent des changements physiques et chimiques durables, et qui peuvent être soit sélectivement réactivés pour entraîner le rappel de l'expérience (**Figure 16**), soit inhibés pour empêcher le rappel de l'expérience (Josselyn et al., 2015 ; Tonegawa et al., 2015,

2018). De nombreuses études ont essayé de caractériser et localiser les engrammes et cela depuis plus de 100 ans. Lashley par exemple réalisait des lésions de certaines régions cérébrales chez le rat en 1917 pour étudier la manière dont cela impactait la mémoire. Cependant les techniques disponibles à l'époque ne permettaient pas d'identifier les engrammes du fait des représentations diverses de la mémoire au sein du cerveau et de sa nature dynamique (Josselyn et al., 2015).

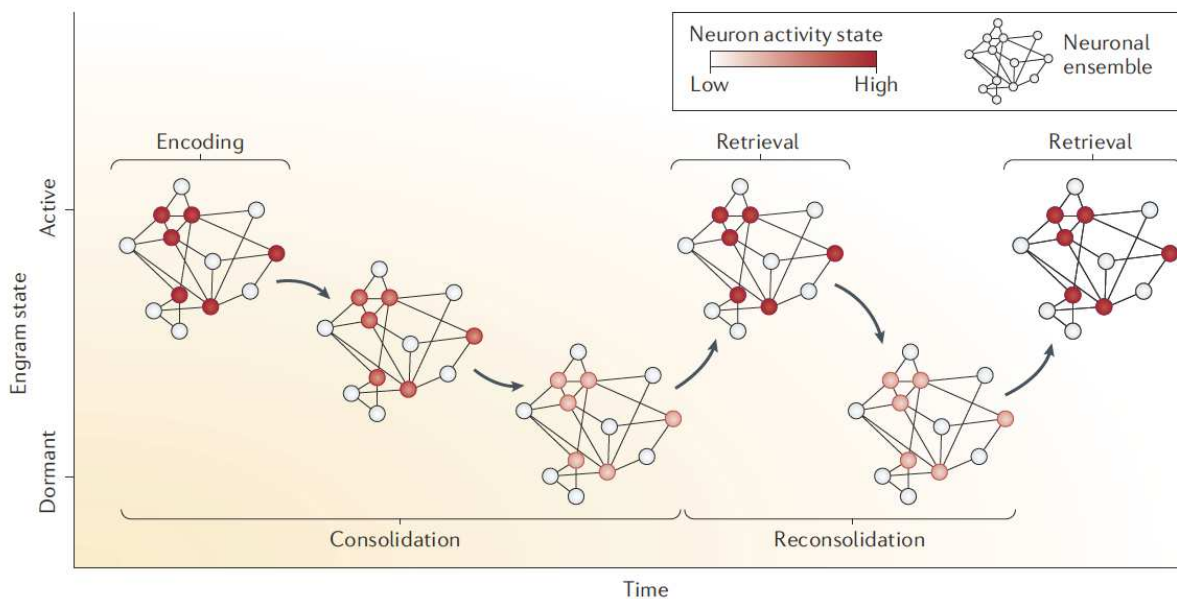


Figure 16. Le déroulement temporel d'un engramme. L'encodage d'un souvenir forme ce qu'on appelle un engramme, c'est à dire le renforcement de connexions entre un ensemble de neurones (en rouge). La consolidation permet de renforcer ces connexions durant le passage d'actif à inactif de l'engramme. Puis ces connexions sont réactivées lors de la récupération du souvenir, et l'engramme est à nouveau dans un état actif durant lequel il peut être modifié avant d'être reconsolidé. Josselyn et al., 2015.

a) L'encodage

Prenons l'exemple de la mémoire épisodique. Lorsqu'un individu vit une situation quelconque, les stimuli sensoriels sont captés par les récepteurs sensoriels et transformés en message nerveux. Ces messages nerveux sont propagés jusqu'aux aires sensorielles attribuées à chaque sens, où ils sont alors traités. Les informations sont ensuite envoyées vers l'**hippocampe** pour y être intégrées en un seul épisode cohérent *via* la **plasticité neuronale**, c'est à dire la formation de synapses et/ou la réorganisation de synapses déjà existantes entre les différents neurones corticaux et hippocampaux (Tonegawa et al., 2018). C'était

l'hypothèse proposée par Hebb : les neurones qui s'activent de manière synchrone créent des connexions afin de former une assemblée (Hebb, 1949).

Ainsi, l'encodage mettrait en place le réseau neuronal nécessaire à la formation de l'engramme, afin qu'il persiste dans le temps où il doit être consolidé (**Figure 16**).

b) La consolidation

(1) *Consolidation synaptique*

Durant l'encodage, l'intégration des informations par l'hippocampe constitue déjà un début de consolidation, qui est nécessaire pour une stabilisation initiale à court terme. Cette **consolidation synaptique** est sous tendue par des processus rapides de l'ordre de la seconde à quelques heures (Nadel et Moscovitch, 1997 ; Dudai, 2004). Elle permet de renforcer les connexions entre les neurones de l'assemblée formant l'engramme. Elle dépend des cascades induites par l'arrivée des messages nerveux à la synapse et qui sont nécessaires à la modification de la synapse (Dudai, 2004). La potentialisation à long terme (PLT) par exemple est une augmentation durable de l'amplitude de la réponse du neurone postsynaptique, suite à une forte stimulation du neurone présynaptique, et renforce donc la synapse. La PLT a été découverte pour la première fois au sein de l'hippocampe en 1973 par Bliss et Lomo (Bliss et Lomo, 1973). La dépression à long terme induit l'effet inverse de la PLT et elle peut également jouer un rôle dans la mémoire, puisque tout comme la PLT elle peut moduler la force des connexions synaptiques.

(2) *Consolidation systémique*

Il existe un autre type de consolidation qui survient des jours à des années après la consolidation synaptique et qu'on appelle la **consolidation systémique**. Elle consiste à relocaliser l'engramme dans une autre région cérébrale. Cette hypothèse avait déjà été soulevée par Théodule Ribot en 1882. Il avait remarqué que certains patients souffrant d'amnésie rétrograde se souvenaient mieux des souvenirs très anciens que des plus récents. Cette dissociation entre souvenir récent et ancien suggère que selon son degré d'ancienneté il y aurait une réorganisation de la mémoire (Ribot, 1882). Le cas du patient H.M. cité précédemment conforte cette hypothèse puisque malgré l'importante lésion des

hippocampes, son amnésie rétrograde ne touchait pas les souvenirs les plus anciens. Ces observations indiquent que l'hippocampe joue un rôle limité dans le temps quant au stockage de la mémoire à long terme (Frankland et Bontempi, 2005). Plusieurs théories ont été formulées quant à la relocalisation de l'engramme et durant les dernières années d'importantes avancées ont été faites, notamment grâce à l'identification d'engrammes et des circuits associés (Frankland et Bontempi, 2005 ; Tonegawa et al., 2018).

(a) La théorie standard de la consolidation

C'est Marr qui, en 1971, propose le premier modèle de consolidation systémique de la mémoire déclarative selon lequel l'hippocampe permet le maintien en mémoire des événements récents avant qu'ils ne soient transférés au cortex pour y être stockés de manière plus durable. Selon lui ce processus de transfert dépend de la réactivation des réseaux neuronaux créés entre le cortex et l'hippocampe lors de l'encodage, et cela durant le sommeil. La réactivation du dialogue hippocampo-cortical permet à la fois de former et de renforcer les connexions cortico-corticales, et de désengager progressivement l'hippocampe au profit d'un souvenir qui devient alors cortical et indépendant de l'hippocampe (**Figure 17**) (Marr, 1971 ; Frankland et Bontempi, 2005). Grâce à différentes études réalisées chez le rongeur, il a été mis en évidence que le **cortex préfrontal médian** (CPFm) est nécessaire à la récupération du souvenir ancien mais pas du récent. Ceci ne permet pas de savoir si l'engramme de la mémoire à long terme ancienne est situé dans le CPFm, ou si celui-ci est simplement impliqué dans le rappel de ce souvenir stocké dans une autre structure corticale (Tonegawa et al., 2018). Cependant, le CPFm est connecté réciproquement avec les cortex sensoriel, moteur et limbique, faisant de lui une région privilégiée pour intégrer des informations de sources variées. Il est donc suggéré que le CPFm serait pour la mémoire à long terme ancienne, ce que l'hippocampe est pour la mémoire à long terme récente (Frankland et Bontempi, 2005).

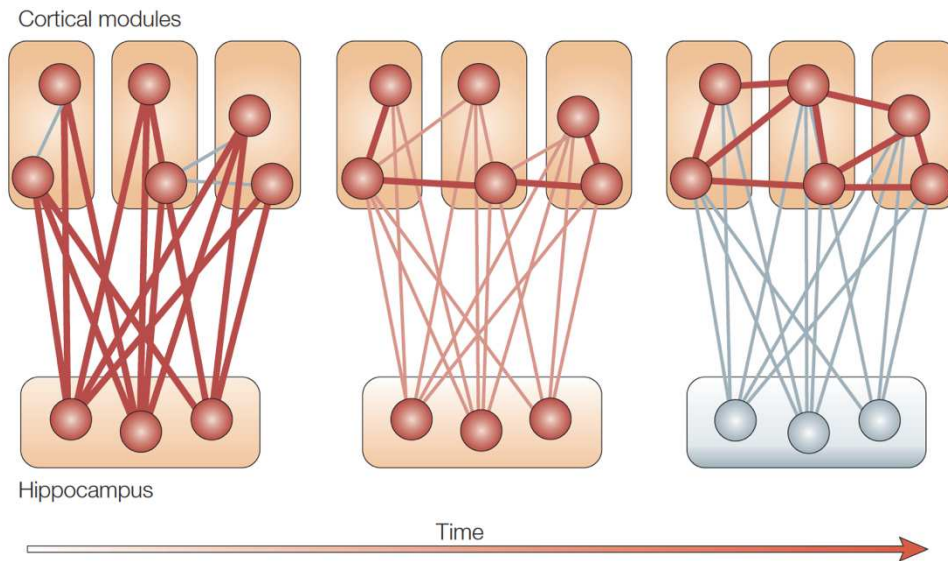


Figure 17. Le modèle standard de consolidation. L'encodage implique dans un premier temps dans les aires primaires sensorielles et associatives, et les informations sont ensuite intégrées dans l'hippocampe pour former les différentes caractéristiques du souvenir. Les réactivations successives du réseau hippocampo-cortical entraînent un renforcement progressif des connexions cortico-corticales (déjà existantes ou nouvelles), qui amènent finalement le souvenir à devenir indépendant de l'hippocampe. Frankland et Bontempi, 2005.

Cependant, l'amnésie rétrograde induite par l'altération des lobes temporaux peut induire une amnésie rétrograde qui est indépendante de l'ancienneté du souvenir, dans quel cas ce modèle ne serait pas adapté (Squire et Alvarez, 1995). De plus, le rappel de souvenirs épisodiques détaillés implique l'activation de l'hippocampe. Or selon la théorie standard de la consolidation, l'hippocampe est désengagé une fois que le souvenir est consolidé dans le cortex (Frankland et Bontempi, 2005).

(b) La théorie de la trace multiple

Nadel et Moscovitch proposent un autre modèle de consolidation systémique en 1997, basé sur le modèle standard de Marr : la théorie de la trace multiple. Ce modèle suggère que lors d'une réactivation de la trace mnésique, l'hippocampe encode une nouvelle trace et que les multiples traces créées lors de ces réactivations partagent en partie ou complètement les informations de l'épisode initial. La création d'une trace multiple facilite alors l'extraction d'une information factuelle de l'épisode encodé, ainsi que son intégration au sein d'une mémoire sémantique préexistante (Nadel et Moscovitch, 1997). En effet la mémoire

sémantique n'est pas innée et provient forcément d'épisodes vécus par le passé. Les informations contextuelles spatiales et temporelles quant à elles nécessitent l'implication continue de l'hippocampe et du cortex frontal respectivement (Nadel et Moscovitch, 1997).

Il est important de noter que dans ce système il n'y a pas de renforcement des connexions cortico-corticales qui permettent un désengagement progressif de l'hippocampe comme cela est le cas dans le modèle de Marr. Au lieu de ça, un dialogue continue d'exister entre l'hippocampe et le néocortex pouvant chacun influencer leurs contenus respectifs, et les souvenirs épisodiques continuent de dépendre de l'hippocampe. Ainsi ces souvenirs peuvent disparaître ou bien bénéficier de la formation de traces multiples. Plus un souvenir est ancien, plus il possède de traces, et plus il est facile de le récupérer. Au contraire, plus un souvenir est récent plus il est vulnérable. Ceci explique qu'un dommage partiel des hippocampes entraîne une amnésie rétrograde de la mémoire épisodique, qui affecte d'avantage les souvenirs les plus récents. Une lésion complète cependant cause une amnésie rétrograde complète de la mémoire épisodique (**Figure 18**) (Nadel et Moscovitch, 1997).

La mémoire sémantique quant à elle, ne nécessitant pas nécessairement de contexte spatio-temporel, devient progressivement indépendante de l'hippocampe, comme dans la théorie standard de la consolidation. C'est pourquoi une lésion partielle ou complète de l'hippocampe n'impacterait pas une information sémantique consolidée depuis longtemps (**Figure 18**).

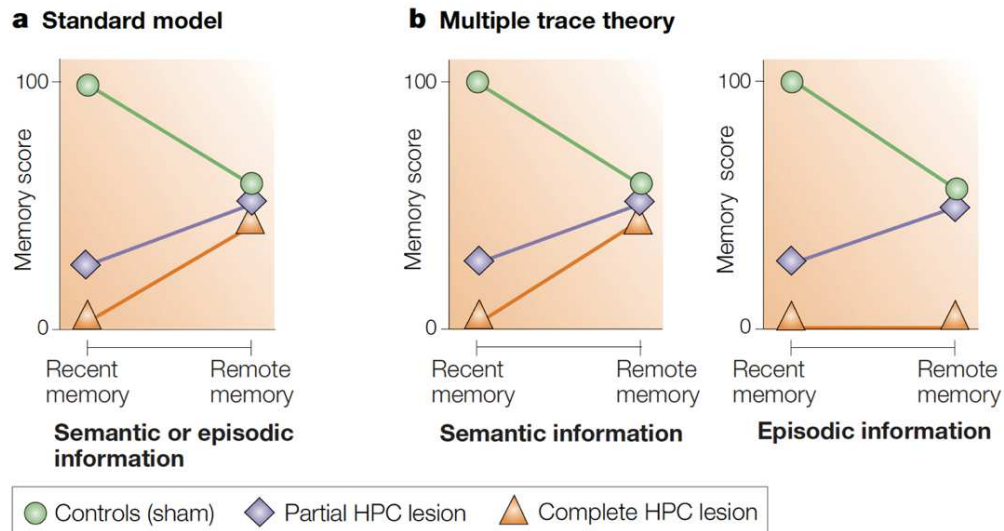


Figure 18. Comparaison du modèle standard de la consolidation et de la théorie de la trace multiple. Représentation schématique du devenir des informations épisodiques et sémantiques dans le modèle standard (a) et dans la théorie de la trace multiple (b), et de ce qu'il advient en cas de lésion partielle ou complète de l'hippocampe. Comme cela peut être observé en (a) et (b), les modèles sont d'accord sur le rôle important de l'hippocampe dans la mémoire récente. Dans le modèle de consolidation standard de la mémoire, il n'existe pas de distinction entre la mémoire épisodique et sémantique, et dans les deux cas la mémoire à long terme de ces souvenirs ne nécessite plus l'hippocampe (a). Cependant dans la théorie de la trace multiple, l'hippocampe n'est pas nécessaire à la mémoire sémantique ancienne car celle-ci est soutenue par le cortex (b), alors que la mémoire épisodique nécessite un dialogue entre l'hippocampe et le cortex. C'est pourquoi lors d'une lésion complète de l'hippocampe il n'est pas possible de rappeler un souvenir épisodique (b). De plus, même avec une lésion totale de l'hippocampe il est toujours possible de rappeler une information épisodique car il existe plusieurs traces de ce souvenir qui est donc moins vulnérable (b). Frankland et Bontempi, 2005.

c) Rappel

Le rappel ou la récupération d'un souvenir signifie avoir accès à des événements ou des informations du passé dont la trace mnésique est consolidée. Comme Hebb le suggérait en 1949, lorsqu'un individu se rappelle un événement, il y a en fait une réactivation de l'engramme initial, c'est à dire une réactivation de l'assemblée de neurones qui avait été activée lors de l'encodage. La réactivation de neurones dans différentes aires sensorielles lors d'un événement présent réactive l'ensemble de l'engramme formé par le passé (**Figure 16**). C'est la force des connexions interneuronales qui détermine à quelle vitesse on arrive à se rappeler un souvenir. De plus, le rappel d'une information ou d'un événement va « transférer » la mémoire à long terme en mémoire à court terme, qui est alors reconsolidée et donc renforcée.

Il y a une différence entre le rappel et la reconnaissance. En effet, la reconnaissance implique une forme de comparaison entre notre mémoire et par exemple la caractéristique d'un objet, d'une personne, ou d'un endroit du présent. S'il y a reconnaissance, cela génère un sentiment de familiarité. Le rappel cependant implique un processus plus conscient d'aller « chercher » les informations dans la mémoire. Par exemple : je croise une personne dans la rue et je reconnais que c'est avec elle que j'ai discuté dans un bar il y a deux semaines, puis j'essaye de me rappeler son prénom. C'est pourquoi le rappel nécessite de réactiver tous les neurones de l'engramme en question, alors que pour la reconnaissance ce n'est pas nécessaire. Une reconnaissance peut tout de même réactiver l'ensemble des neurones (Anon, 2019).

II. Objectifs de la thèse

La MCL est décrite au niveau neuropathologique par la présence de CL constitués majoritairement d' α -syn. En se basant sur l'hypothèse selon laquelle les symptômes cliniques présentés par les patients seraient directement liés à la localisation de la pathologie Lewy dans le cerveau (Mattila et al., 2000 ; Harding et Halliday, 2001 ; Braak et al., 2003a ; Kövari et al., 2003 ; Schneider et al., 2012 ; Adamowicz et al., 2017a), le modèle SNCA a été choisi. En effet, ce modèle surexprime l' α -syn sous le promoteur Thy-1, majoritairement dans le cortex et l'hippocampe, régions particulièrement impliquées dans les fonctions cognitives, et plus particulièrement la mémoire. Le développement d'une pathologie dans ces structures pourrait donc induire un phénotype cognitif relativement proche de la MCL, puisque les patients qui présentent une atteinte prédominante du néocortex et du système limbique ont plus de chance d'évoluer vers une MCL (Marui et al., 2002 ; McKeith et al., 2017). Le premier objectif de ma thèse a donc été de caractériser ce modèle d'un point de vue comportemental essentiellement cognitif, et d'un point de vue anatomopathologique, en ciblant l'étude sur la présence de l' α -syn pS129, qui est considéré comme un marqueur des synucléinopathies. Cette analyse permet d'étudier le principe de corrélation entre les déficits présentés par le modèle et la présence cérébrale de la pathologie dans des régions spécifiques.

Dans un second temps, nous avons voulu amplifier le phénotype présenté par le modèle SNCA. Pour cela, nous nous sommes basés sur de récentes études démontrant une altération structurelle et fonctionnelle précoce du CI ant chez des patients atteints de MCL (Blanc et al., 2014, 2015, 2016 ; Roquet et al., 2017). D'autres part, depuis 2012 de nombreuses études ont pu mettre en évidence un mécanisme de transmission et de propagation de type prion de la pathologie α -syn (Luk et al., 2012b, 2012a ; Masuda-Suzukake et al., 2013 ; Sacino et al., 2013, 2014 ; Recasens et al., 2014 ; Bernis et al., 2015 ; Peelaerts et al., 2015 ; Hu et al., 2016 ; Rey et al., 2016, 2018). Ainsi, afin d'induire une altération précoce du CI ant chez les souris SNCA, nous avons décidé d'y injecter bilatéralement des fibrilles pathologiques d' α -syn. Lorsque les souris étaient âgées de 12-14 mois, c'est à dire 7-9 mois p.i. de fibrilles, j'ai réalisé une caractérisation comportementale du même type que celle effectuée sur le modèle SNCA. Ceci permet de déterminer si la présence précoce de pathologie α -syn dans le CI ant altère davantage les fonctions cognitives des souris SNCA.

Parallèlement à cela nous avons réalisé des injections unilatérales des mêmes fibrilles d' α -syn dans le CI ant de souris WT. Cette étude permet d'identifier la propagation ipsilatérale et controlatérale de la pathologie α -syn pS129 au sein du cerveau, à partir du CI ant, puisque cela n'a jamais été fait auparavant.

L'objectif global de cette étude est de générer de nouveaux modèles pertinents de MCL qui pourraient être utilisés pour la compréhension des mécanismes pathologiques de la maladie. A plus long terme, ces modèles pourraient être utilisés pour l'identification de biomarqueurs, ou pour développer des cibles thérapeutiques.

III. Matériel & méthode

A. Animaux

1. Généralités

Les souris sont hébergées dans une animalerie éclairée selon un cycle 12h/12h (période éclairée 7h-19h), à température et hygrométrie régulées ($23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$; $50\% \pm 10\%$), dans des cages transparentes rectangulaires (32 x 16 x 14 cm) par fratrie (5 souris maximum par cage), avec nourriture et boisson *ad libitum*, et avec un fond sonore constant. Celles destinées au comportement sont placées dans des cages individuelles (29,5 x 11,5 x 13 cm) une semaine avant le début des tests. L'ensemble des expérimentations est réalisé dans le respect des directives européennes en vigueur sur la protection des animaux de laboratoire (2010/63/UE, numéro d'agrément du laboratoire G67-482-13), et a été approuvé par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de l'Université de Strasbourg (CREMEAS), ainsi que par le Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS #406, #9203).

2. Le modèle SNCA

Les souris hétérozygotes mThy1-hSNCA, lignée 12, ont été obtenues par *Jackson Laboratory* (C57BL/6N-Slc4a7^{Tg(Thy1-SNCA)12Mjff}/J, stock No 016936). Ce modèle a été développé par la fondation Michael J. Fox pour la recherche contre la MP. Il surexprime 23 copies du gène SNCA de l' α -syn humaine ($h\alpha$ -syn) non mutée sous le promoteur Thy-1 murin (mThy1). Ceci induit une expression deux fois plus importante d' $h\alpha$ -syn que d' α -syn endogène, particulièrement dans le cortex et l'hippocampe (www.jax.org/strain/016936). La construction transgénique a été microinjectée dans des ovocytes fertilisés, et l'introduction du transgène dans le chromosome 14 a induit une duplication dans la séquence du gène Slc4a7, ce qui cause un KO fonctionnel du gène chez les souris homozygotes. Les souris hétérozygotes sont viables et fertiles. Le modèle n'a jamais été phénotypé auparavant.

La lignée a été maintenue au laboratoire sur un fond génétique C57BL/6J (croisement des mâles transgéniques avec les femelles WT). Les souris hétérozygotes obtenues de ce croisement constituent le **modèle SNCA**. La caractérisation a été réalisée uniquement sur les souris mâles WT et SNCA (provenant des mêmes portées), ce qui permet de réduire la

variabilité interindividuelle pouvant être causée par l'utilisation de femelles, puisque celles-ci sont soumises à des variations des taux d'œstrogènes pouvant influencer les processus d'apprentissage. La caractérisation comportementale des souris SNCA a été réalisée à 12-14 mois avec $n = 20$ WT + 15 SNCA. La caractérisation du phénotype moteur a été réalisée à 18 mois sur une cohorte différente avec $n = 8$ WT + 7 SNCA. Pour la caractérisation neuropathologique à 14 mois, on dispose de $n = 8$ WT + 7 SNCA pour les analyses Western blot, et de $n = 4$ WT + 3 SNCA pour les immunohistochimies. Un tableau récapitulatif des expérimentations réalisées sur le modèle SNCA est disponible en annexe (**Annexe 1**).

B. Injection de fibrilles d' α -syn par chirurgie stéréotaxique

1. Principe de la chirurgie stéréotaxique

La chirurgie stéréotaxique est une technique de neurochirurgie permettant de cibler de manière reproductible une région cérébrale précise afin de réaliser diverses procédures intracérébrales (injection, prélèvement, implantation de canule ou d'électrode...). Pour cela, il existe des atlas stéréotaxiques qui référencent les coordonnées des différentes structures cérébrales dans 3 axes : antéropostérieur (AP), médiolatéral (ML) et dorsoventral (DV).

Dans un premier temps, nous avons donc déterminé plusieurs coordonnées d'injection permettant de cibler le cortex insulaire antérieur (CI ant) grâce à l'atlas stéréotaxique « The Mouse Brain » de Franklin et Paxinos (2001). Les coordonnées utilisées ont été prises à partir de la surface du crâne, et par rapport au bregma qui est l'intersection entre les sutures sagittale et frontale (**Figure 19**). Le lambda constitue un autre point de repère qui est l'intersection entre les sutures sagittale et lambdaïde.

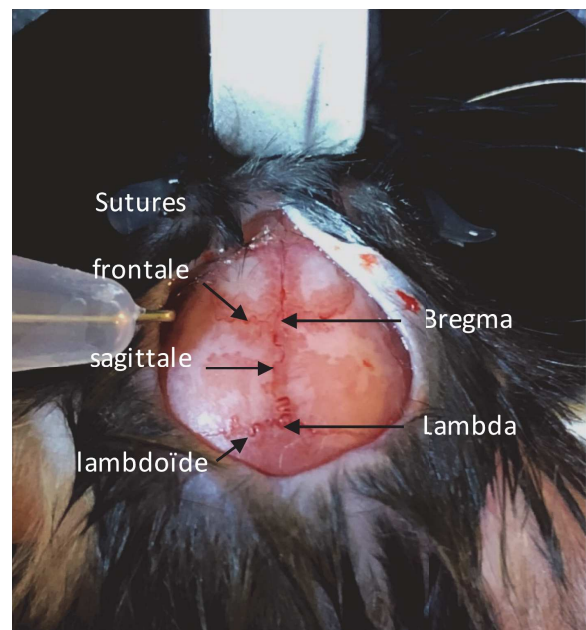


Figure 19 : Les sutures crâniennes, le bregma et le lambda. L'intersection entre les sutures frontale et sagittale forme le bregma, et l'intersection entre les sutures sagittale et lambdaïde forme le lambda.

2. Dispositif

Le cadre stéréotaxique est en forme de U avec deux barres d'oreilles permettant d'immobiliser latéralement la tête de la souris, et d'une barre d'incisives permettant de fixer le museau (**Figure 20**). Le bregma et le lambda sont situés sur le même plan horizontal. Une fois que toutes ces barres sont réglées et les vis serrées, la tête de la souris ne peut plus bouger. Le cadre comporte trois micromanipulateurs placés dans trois axes orthogonaux (AP, ML, DV), chacun étant équipé d'un vernier permettant de mesurer précisément la distance de déplacement du descendeur selon chaque axe (**Figure 20**). Un adaptateur à seringue est fixé sur le descendeur qui est déplacé dans l'espace tridimensionnel à l'aide de trois vis micrométriques. L'injection des monomères et des fibrilles est réalisée manuellement grâce à une seringue Hamilton® Neuros™ 2 µl (7002, P/N 65459-01, Hamilton®) fixée sur le descendeur grâce à l'adaptateur de seringues.

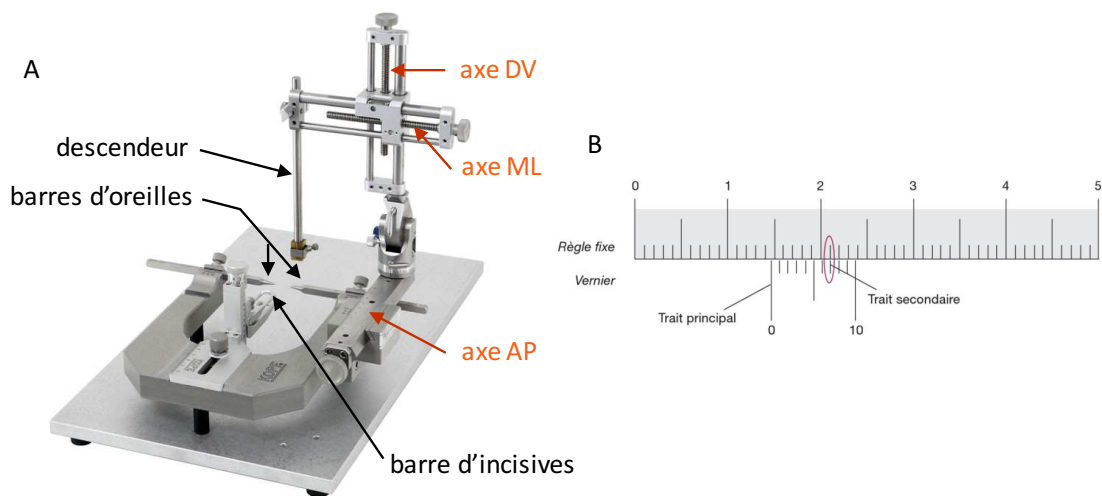


Figure 20. L'appareil stéréotaxique. (A) Photographie d'un appareil stéréotaxique. Les axes des trois micromanipulateurs sont indiqués en orange. (B) Fonctionnement du vernier. On lit 14,7 mm (avec une précision de 0,1 mm). AP, antéropostérieur ; DV, dorsoventral ; ML, médiolatéral.

3. Protocole expérimental

Les souris sont anesthésiées et placées dans le cadre stéréotaxique. Les méthodes d'anesthésies ont été modifiées au cours des différentes chirurgies et sont décrites dans le

tableau 7. Nous avons arrêté d'utiliser le pentobarbital sodique en anesthésie en raison d'une modification dans la législation, stipulant qu'il ne devait être utilisé que pour des procédures sans réveil en raison de sa toxicité pour l'animal. Nous sommes alors passé au mélange kétamine/xylazine. Nous avons finalement réalisé les chirurgies sur les cohortes principales de l'étude en plaçant les souris sous anesthésie gazeuse (isoflurane) (**Tableau 7**). Cette méthode d'anesthésie permet de contrôler la profondeur et la durée de l'anesthésie, et l'anesthésie et l'analgésie sont de meilleure qualité que l'anesthésie injectable. De plus, le réveil de l'animal est plus rapide. Nous ne disposons pas du matériel nécessaire à l'anesthésie gazeuse auparavant.

Tableau 7. Méthodes d'anesthésies utilisées pour les chirurgies stéréotaxiques.

Chirurgies stéréotaxiques	Méthodes d'anesthésies
Essais pour déterminer les coordonnées stéréotaxiques du CI ant : injections de monomères d' α -syn ATTO488	Pentobarbital sodique Concentration = 5,47 mg/mL ; 0,52 mL / 20g Pentobarbital® sodique, Ceva Santé Animale
Injections unilatérales de fibrilles d'α-syn dans le CI ant de souris WT et SNCA. Mise à mort 4 mois p.i.	Mélange kétamine/xylazine (Imalgène/Rompun) Concentration = kétamine 10mg/mL, xylazine 1mg/mL ; 0,1 mL / 10g (100mg kétamine/kg et 10mg de xylazine/kg) Imalgène 1000, Laboratoire Merial Rompun 2%, Laboratoire Bayer
Injections bilatérales de fibrilles d'α-syn dans le CI ant de souris SNCA. Mise à mort 9 mois p.i.	Anesthésie gazeuse à l'isoflurane Induction 3% d'isoflurane jusqu'à ce que la respiration soit lente (2min), puis 2% pendant 4min. 1,5%-1% dans le masque d'anesthésie gazeuse pendant la procédure. Isoflo®, Zoetis France
Injections unilatérales de fibrilles d'α-syn dans le CI ant de souris WT. Mise à mort 7 et 12 mois p.i.	Anesthésie gazeuse à l'isoflurane Induction 3% d'isoflurane jusqu'à ce que la respiration soit lente (2min), puis 2% pendant 4min. 1,5%-1% dans le masque d'anesthésie gazeuse pendant la procédure. Isoflo®, Zoetis France
Injections unilatérales de fibrilles d'α-syn dans le striatum de souris WT. Mise à mort 4 mois p.i.	Anesthésie gazeuse à l'isoflurane Induction 3% d'isoflurane jusqu'à ce que la respiration soit lente (2min), puis 2% pendant 4min. 1,5%-1% dans le masque d'anesthésie gazeuse pendant la procédure. Isoflo®, Zoetis France

Lorsque le système d'anesthésie gazeuse est utilisé, la souris doit être placée très rapidement sur la barre d'incisives autour de laquelle est située le masque d'anesthésie. La souris est ensuite placée dans le cadre afin que la tête soit complètement immobilisée. Une plaque chauffante autorégulée reliée à une sonde thermique rectale (ATC2000, WPI) est placée sous la souris afin de maintenir sa température corporelle. Une pommade ophtalmique est appliquée sur les yeux des souris afin d'éviter un dessèchement de la cornée (VITAMINE A DULCIS, Allergan). Le scalp de la souris est ensuite désinfecté (alcool 70 %) puis incisé de manière longitudinale. Le champ est alors immédiatement inondé de lidocaïne (Xylovet®, Ceva Santé Animale) afin de réaliser une anesthésie locale. La peau est ensuite écartée afin de laisser apparaître le crâne : il faut pouvoir voir à la fois le bregma et le lambda (**Figure 21**). Si nécessaire des écarteurs sont placés pour garder le champ opératoire libre. La surface du crâne exposée est alors nettoyée, et asséchée avec un peu d'eau oxygénée afin de bien voir les sutures. Il faut alors mesurer les coordonnées DV du bregma et du lambda en posant l'aiguille sur la boîte crânienne afin de vérifier si la tête de la souris est en position « flat skull » (une différence de 0,1 mm est tolérée). Si ce n'est pas le cas, on desserre la vis qui serre le museau sur la barre d'incisives afin de régler la hauteur de cette dernière jusqu'à être en « flat skull ». On peut alors prendre l'ensemble des coordonnées du bregma afin de calculer les coordonnées des sites d'injection. On marque un repère au crayon sur la boîte crânienne et on la perfore à l'aide d'une fraise dentaire de sorte à ce que l'aiguille puisse être descendue dans le parenchyme cérébral jusqu'à la coordonnée DV calculée (**Figure 21**).



Figure 21 : Injektion stéréotaxique dans le cortex insulaire antérieur d'une souris.

Une fois que les injections sont réalisées, le crâne est nettoyé, le scalp suturé, et on réalise une injection sous cutanée d'anti-inflammatoire (0,002 $\mu\text{l/g}$, Métacam®, Boehringer Ingelheim) dans la nuque de la souris. Les souris sont placées dans des cages propres individuelles sous une lampe chauffante durant leur phase de réveil, puis ramenées dans leur animalerie où leur état global est surveillé chaque jour durant la semaine suivant la chirurgie.

a) Mise au point des coordonnées stéréotaxiques pour le cortex insulaire antérieur (CI ant)

Nous avons d'abord déterminé les coordonnées d'injection par rapport au bregma permettant de cibler le CI ant grâce à l'atlas stéréotaxique « The Mouse Brain » de Franklin et Paxinos (2001) : AP = + 1,34 mm ; ML = ± 3,2 mm ; DV = - 3,2 mm. Nous avons ensuite réalisé des injections de monomères d'hα-syn marqués par l'ATTO 488 qui émet dans le vert ($\lambda_{\text{excitation}} = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$) à ces coordonnées. Les souris sont mises à mort par dislocation cervicale le lendemain, le cerveau est prélevé, fixé dans du PAF 4 % pendant 12 h, placé dans une solution de glucose à 20 % pendant 48 h, congelé puis coupé au cryostat. Des coupes flottantes frontales de 30 μm d'épaisseur sont réalisées, puis montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage adapté à la fluorescence (Mowiol®, Sigma-Aldrich). Les coordonnées d'injection sont observées au microscope à fluorescence. De nouveaux essais ont été réalisés puis nous avons déterminé les coordonnées finales d'injection dans le CI ant : AP = + 1,34 mm ; ML = ± 3,4 mm ; DV = - 4 mm.

b) Injections des fibrilles d'hα-syn dans le CI ant

Les fibrilles d'hα-syn ont été générées à partir d'hα-syn recombinante par nos collaborateurs de l'Institut de Neurosciences de Paris-Saclay, les Dr. Ronald Melki et Luc Bousset (Bousset et al., 2013). Nous avons injecté 1 μl de solution de fibrilles à 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ par site avec une vitesse d'environ 0,4 $\mu\text{l}/\text{min}$. L'aiguille est maintenue en place pendant 2 min 30 s après l'injection puis remontée de 0,2 mm et à nouveau laissée en place 2 min 30 s avant d'être retirée du parenchyme. Cela permet de limiter les remontées provoquées par le phénomène d'aspiration lors de la sortie de l'aiguille. Dans le cas des injections bilatérales, il faut veiller à bien nettoyer l'aiguille à l'aide de cotons tiges imbibés d'eau avant de réaliser la deuxième injection, afin d'éviter de « semer » davantage de fibrilles dans la trace d'injection. Les souris contrôles sont quant à elle injectées avec du tampon phosphate salin (PBS). Toujours dans le cadre de la mise au point des injections de fibrilles, nous avons réalisé des injections unilatérales chez des souris WT et SNCA âgées de 4 mois, que nous avons mises à mort 4 mois p.i. Les cerveaux ont été prélevés afin d'observer la pathologie $\alpha\text{-syn pS129}$. Toutes les injections de fibrilles d'hα-syn réalisées dans le CI ant et présentées dans ce manuscrit sont récapitulées dans les tableaux en **Annexe 2** et **Annexe 3**.

Afin de dissocier les fibrilles d' α -syn, la seringue Hamilton est remplie de SDS 2 % pendant 1 h minimum à température ambiante, avant d'être nettoyée avec la solution de nettoyage pour seringues Hamilton Neuros (P/N 18211, Hamilton®).

c) Injections des fibrilles d' α -syn dans le striatum

Pour réaliser les injections « contrôles » dans le Str, nous n'avons pas réalisé d'essais préalables puisque le Str est une structure assez large et étendue. Nous avons choisi d'injecter les fibrilles de manière unilatérale dans le Str dorsal aux coordonnées suivantes : AP = + 1 mm ; ML = - 1,8 mm ; DV = - 3 mm. Pour ce groupe contrôle, 6 souris WT (2 mâles et 4 femelles) ont été injectées avec les fibrilles d' α -syn et ont été mises à mort à 4 mois post-injection (p.i.) afin de réaliser une caractérisation anatomopathologique. Les analyses réalisées sur cette cohorte sont récapitulées en **Annexe 4**.

4. Les modèles fibrilles

a) SNCA fibrilles (SNCA FIB)

La cohorte « SNCA FIB » est composée de trois groupes expérimentaux : n = 13 WT PBS + 9 SNCA PBS + 11 SNCA FIB. Les fibrilles ont été injectées de manière bilatérale dans le CI ant des souris. Les WT PBS et les SNCA PBS ont subi la même chirurgie que les SNCA FIB mais ont reçu du PBS au lieu des fibrilles : ce sont les groupes contrôles. Les souris ont été opérées à l'âge de 5 mois, et sont testées à 12 mois, c'est à dire 7 mois p.i. La caractérisation comportementale s'étend de 7 à 9 mois p.i. puis les souris ont été mises à mort par perfusion intracardiaque afin de réaliser la caractérisation anatomopathologique. Les manipulations réalisées sur cette cohorte sont récapitulées en **Annexe 3**.

b) WT fibrilles (WT FIB)

La cohorte « WT FIB » est destinée à l'analyse anatomopathologique de la propagation de la pathologie α -syn pS129 à partir du CI ant. De ce fait, les souris ont subi une injection unilatérale de fibrilles dans le CI ant à l'âge de 5 mois, aux mêmes coordonnées que la cohorte « SNCA FIB ». L'injection unilatérale permet de voir si la pathologie propage également en controlatéral. Il existe deux groupes expérimentaux et deux délais post-injection donc quatre groupes au total : n = 6 WT PBS + 6 WT FIB à 7 mois p.i., et n = 6 WT PBS + 6 WT FIB à 12 mois

p.i. Les souris du groupe 7 mois p.i. sont âgées de 12 mois, et celles du groupe 12 mois p.i. sont âgées de 17 mois. Les analyses réalisées sur cette cohorte sont récapitulées en **Annexe 2** (partie bleue).

C. Tests comportementaux

1. Manipulation des souris

Afin de réduire au maximum le stress lié à la manipulation des souris lors des tests comportementaux, les animaux doivent préalablement être habitués à l'expérimentateur, ainsi qu'au dispositif de préhension s'il y en a un. Ceci est vrai pour l'ensemble des tests que j'ai réalisés lors de ma thèse, excepté pour deux d'entre eux : le test du labyrinthe en croix surélevé qui permet d'évaluer l'anxiété, et le test d'activité locomotrice en cage d'hébergement. Les souris sont isolées seulement après l'évaluation de leur niveau d'anxiété basale. Le phénotypage comportemental a été réalisé sur des souris mâles afin de s'affranchir de l'impact du cycle hormonal des femelles sur les résultats des tests.

Lors des trois jours qui précèdent le début du reste de l'analyse comportementale, les souris sont manipulées deux fois par jour. Pour cela l'expérimentateur attrape la souris par la base de la queue et la pose sur son bras, puis la laisse se déplacer sur celui-ci en la maintenant toujours par la queue. Selon le dispositif expérimental, il est également possible d'utiliser un tube pour y transporter la souris depuis sa cage d'hébergement. En effet, ne pas toucher la souris permet de réduire considérablement son stress. Pour cela, la semaine précédant la tâche comportementale, un tube est placé dans chaque cage d'hébergement, permettant aux souris de se familiariser avec ce dernier. Les trois derniers jours précédant la tâche, les souris sont déplacées deux fois par jour de leur cage d'hébergement vers une grande cage vide, puis à nouveau dans leur cage via leur tube respectif. Le tube ne doit pas être changé avant la fin du protocole expérimental.

2. Labyrinthe en croix surélevé

a) Dispositif et principe

Ce dispositif en forme de croix possède deux bras fermés avec parois opaques d'une hauteur de 14,5 cm (obscurs donc sécurisants) et deux bras ouverts (lumineux donc aversifs), surélevés à une hauteur de 53 cm du sol. L'espace central de 5x5 cm relie les quatre bras d'une longueur de 35 cm et d'une largeur de 5 cm (**Figure 22A**). Les bras ouverts possèdent des rebords d'une hauteur de 0,5 cm afin d'éviter les chutes. Une caméra placée au-dessus du dispositif est reliée à un ordinateur pour suivre en temps réel le déplacement de la souris (**Figure 22B**), et le logiciel Any-Maze permet d'enregistrer les paramètres à analyser pour ce test (nombre d'entrées et temps passé dans les

bras). Ce test permet d'évaluer le niveau d'anxiété des souris en se basant sur le conflit entre leur désir d'explorer un nouvel environnement, et leur aversion pour les espaces ouverts et lumineux. L'anxiété du rongeur se traduit donc

par un évitement des zones ouvertes au profit des bras fermés, et à l'inverse, un comportement non anxieux est traduit par un nombre élevé d'entrées dans les bras ouverts.

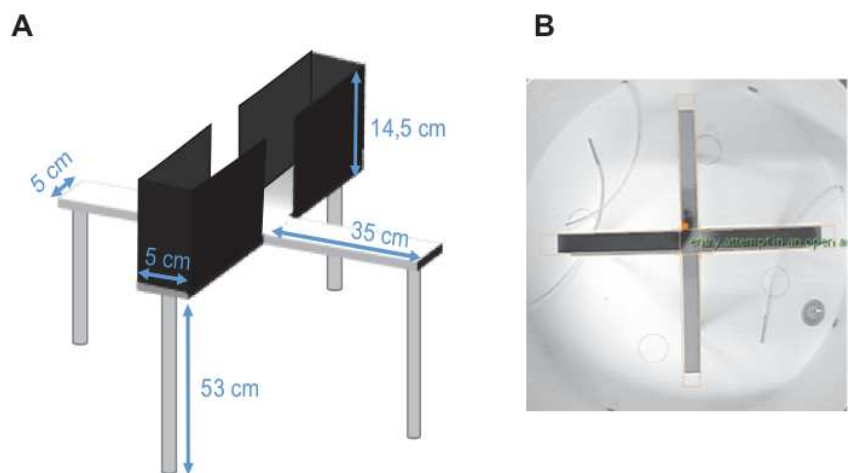


Figure 22. Dispositif du labyrinthe en croix surélevé. (A) Schéma représentant le labyrinthe en croix surélevé. (B) Image prise par la caméra placée au-dessus du labyrinthe en croix surélevé.

b) Protocole expérimental

Ce test est le premier effectué sur la cohorte de souris afin qu'elles n'aient jamais été manipulées auparavant. En effet, la manipulation répétée entraîne une diminution du stress des souris, or nous souhaitons évaluer leur anxiété basale. Les souris sont placées dans la pièce où se trouve le dispositif 30 min avant le début du test. Chaque souris est placée au centre du labyrinthe, à l'intersection des bras, tête orientée vers un bras ouvert. L'exploration est enregistrée pendant 10 min à l'issue de laquelle la souris est replacée dans sa cage de

stabulation. Le labyrinthe est nettoyé à l'eau puis à l'alcool à 35 % après chaque passage afin de réduire et d'uniformiser les traces olfactives.

3. **Activité locomotrice spontanée**

a) Dispositif et principe

Le rythme nyctéméral caractérise un cycle biologique de 24h défini par l'alternance d'un jour et d'une nuit. Le cycle nyctéméral est habituellement régulé par la variation rythmique et naturelle de luminosité (intensité et durée de la phase lumineuse). Pour les animaux de laboratoire, ce cycle est déterminé par les lumières artificielles de l'animalerie. L'actographie consiste à enregistrer l'activité locomotrice spontanée diurne et nocturne des rongeurs sur une longue période. Les phases lumineuse (jour) et nocturne (nuit) durent chacune 12h en animalerie. L'activité locomotrice des souris est mesurée dans leur cage pendant trois nuits et deux jours, avec une phase d'habituation de 3h précédant la première nuit. Les cages de chaque souris sont placées sur un rack muni de cellules photoélectriques qui émettent des faisceaux infrarouges à chaque extrémité des cages (**Figure 23**). Ce dispositif est relié à un ordinateur où un logiciel comptabilise les croisements de faisceaux par les souris. Le croisement successif des deux faisceaux comptabilise un déplacement horizontal et reflète l'activité locomotrice des souris.



Cellules photoélectriques

Figure 23. Dispositif de l'actographie. Photographies montrant le placement de la cage dans le rack d'actimétrie et les cellules photoélectriques qui permettent de détecter les croisements des faisceaux infrarouges.

b) Protocole expérimental

Les souris sont placées dans des cages individuelles (29,5 x 11,5 x 13 cm) avec un fond de litière propre et une poignée de leur litière. Les cages sont placées sur le rack d'actographie, puis l'activité locomotrice spontanée est enregistrée à une fréquence d'acquisition de 10 min pendant une période d'habituation de 3 h, puis durant 66 h.

L'activité locomotrice des souris durant la première nuit est généralement plus élevée que les deux nuits suivantes. Il est donc possible d'exclure cette nuit de l'analyse afin que les résultats reflètent mieux l'activité locomotrice habituelle des souris.

4. Test de la piscine de Morris

a) Dispositif et principe

Le dispositif est une piscine circulaire de 146 cm de diamètre dont la paroi est haute de 60 cm (**Figure 24A**). L'eau est opacifiée grâce à du Blanc de Meudon (Onyx) et sa température est maintenue à $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. La superficie totale est divisée en quatre quadrants virtuels : Nord-Est (NE), Nord-Ouest (NO), Sud-Ouest (SO) et Sud-Est (SE). Une plateforme hydraulique en plexiglas transparent de 10 cm de diamètre (plateforme Atlantis, Ugo Basile S.R.L.) est placée dans le quadrant SE (**Figure 24B**). Des indices visuels distaux fixes sont présents dans la pièce (**Figures 24A et B**). Une caméra placée au-dessus de la piscine et reliée à un ordinateur permet de visualiser et d'enregistrer le déplacement de la souris en temps réel. Le logiciel Any-Maze permet ensuite d'analyser plusieurs paramètres nécessaires à l'analyse du comportement. La piscine de Morris est un test qui permet d'évaluer, entre autres, la mémoire spatiale de référence. Ce test est basé sur l'aversion à l'eau fraîche pour les souris, les poussant à trouver une échappatoire. Pour cela elles doivent retrouver une plateforme immergée, donc non visible, dont la localisation reste fixe au cours des essais, en se basant sur les indices visuels distaux. La phase d'apprentissage permet d'évaluer l'acquisition d'une mémoire spatiale, et les rappels de tester la mémoire spatiale à long terme récente et ancienne.

b) Protocole expérimental

Avant le début du test les souris sont placées 30 min dans la pièce. La première phase du test est la **familiarisation** en deux étapes (**Figure 24C**). Le premier jour, chaque souris

effectue un essai avec plateforme visible et 5 cm d'eau, d'une durée de 1 min. Le point de lâcher est au centre de la piscine, et la plateforme se trouve dans le quadrant NO, 1 cm au-dessus de la surface de l'eau. Cette étape appelée « habitude » permet aux animaux de se familiariser au dispositif, ainsi qu'à la tâche à effectuer, c'est à dire trouver la plateforme pour se soustraire à l'eau. Le lendemain, les souris sont chacune replacée dans la piscine, mais avec une hauteur d'eau de 40 cm et sans plateforme pendant 2 min. Cette étape est appelée la « nage forcée » et sert à habituer la souris à nager sans voir ni trouver de plateforme, mais également à vérifier l'absence (ou la présence) d'un biais naturel de l'animal pour un quadrant spécifique. S'il existe une préférence envers un quadrant, il ne faudra pas placer la plateforme dans ce quadrant lors de l'acquisition de la mémoire spatiale.

La deuxième phase est celle d'**apprentissage** avec 5 jours d'acquisition (J1 - J5) à raison de 4 essais discrets par jour (**Figure 24C**). La plateforme est placée dans le quadrant SE à 1,5 cm sous la surface de l'eau opacifiée de manière à la rendre invisible au rongeur. Les souris sont testées par série de 3 et le point de lâcher est différent pour chaque essai, l'ordre de ces points de lâcher variant chaque jour afin de favoriser l'apprentissage spatial. L'essai est fini lorsque le rongeur a atteint la plateforme ou si les 60 s de test se sont écoulées. A l'issue de l'essai, si la souris n'a pas trouvé la plateforme, l'expérimentateur doit l'y diriger. Chaque souris doit être laissée 10s sur la plateforme afin qu'elle puisse regarder autour d'elle, puis elle est récupérée et placée dans sa cage de stabulation sous une lampe chauffante. L'apprentissage spatial se traduit par une diminution de la latence et de la distance d'accès à la plateforme au cours des jours.

La dernière phase est celle de **rappel** où les mémoires à long terme récente (24h) et ancienne (21j) sont testées par des tests de rappel à J5 et J5 + 21j respectivement (**Figure 24C**). Pour cela, la plateforme est abaissée pour que la souris ne puisse pas la trouver et chaque souris effectue un essai d'une durée de 60s. Le temps passé dans le quadrant cible est analysé, et s'il est significativement supérieur au hasard, c'est à dire à 15s (60s/4 quadrants), cela signifie que le rongeur se souvient de la localisation de la plateforme. Les mémoires récente et ancienne sont évaluées sur la même cohorte. Ainsi, à l'issue du rappel 24h, la plateforme est remontée à la surface de l'eau pour que les souris puissent s'y arrêter. Suite au rappel, toutes les souris effectuent une dernière acquisition avec 4 essais comme les jours précédents. Cela permet d'éviter un phénomène d'extinction du souvenir spatial.

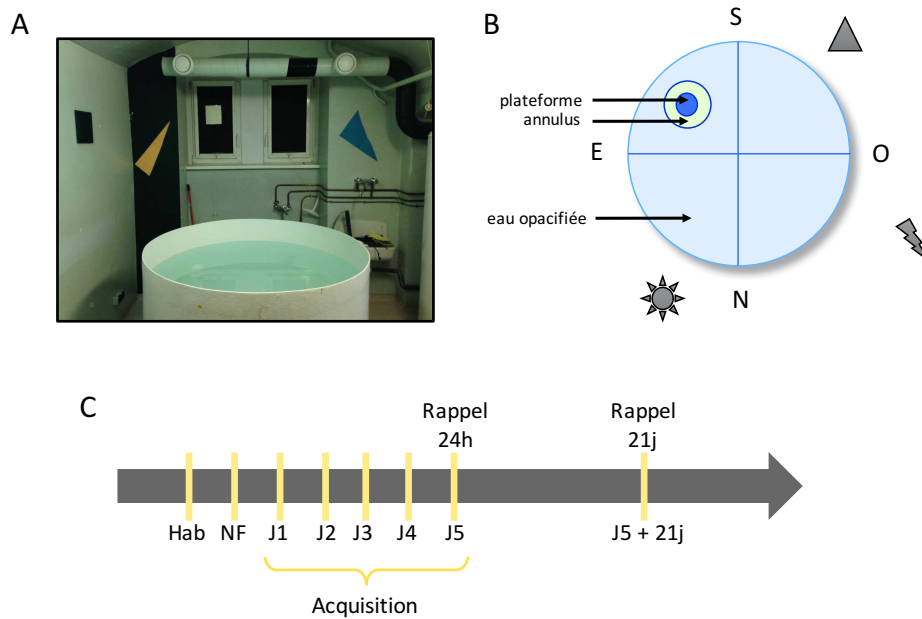


Figure 24. Piscine de Morris. (A) Photographie de la piscine de Morris. La pièce est peinte de manière contrastée pour fournir des indices spatiaux. (B) Schéma représentatif du dispositif. La plateforme est placée dans le quadrant Sud-Est. (C) Protocole d'apprentissage spatial et de rappel en mémoire à long terme récente (24h) et ancienne (21j). *S*, sud ; *E*, est ; *N*, nord ; *O*, ouest ; *Hab*, habituation ; *NF*, nage forcée.

5. Tests de mémoires de reconnaissances d'objets

La mémoire de reconnaissance peut être définie comme la capacité à reconnaître certaines caractéristiques d'un objet par exemple (Brown et Aggleton, 2001). La reconnaissance génère un sentiment de familiarité.

a) Principe du test

Les tests de mémoires de reconnaissances d'objets se basent sur le caractère curieux des souris qui cherchent à explorer de manière spontanée ce qui est leur est nouveau. Dans le test de **reconnaissance de nouvel objet** (RNO), un nouvel objet est placé dans un environnement familier avec un autre objet familier. Si les souris reconnaissent l'objet familier, elles explorent davantage le nouvel objet. Dans le test de **localisation d'objet** (LO), c'est la nouvelle position d'un objet familier qui poussera les souris à explorer l'objet. Ce test

est une manière d'évaluer la mémoire spatiale, en se basant sur la configuration spatiale de trois objets, et d'un indice visuel présent sur une paroi du dispositif expérimental. Les tests d'« **object-in-place** » (OiP) et de **mémoire de l'ordre temporel** (mOT) sont des tests de mémoire associative qui permettent d'évaluer la capacité des souris à associer respectivement le « quoi » et le « où » (l'objet et la position), et le « quoi » et le « quand » (l'objet, et la notion de proximité temporelle de présentation de l'objet).

b) Dispositif expérimental

Les objets utilisés diffèrent en termes de taille, forme, couleur, et matériaux (**Figure 25**). Des analyses préliminaires ont été réalisées au laboratoire afin de former des couples ou trios d'objets n'induisant pas de biais d'exploration préférentielle envers un objet en particulier.

Le test se déroule dans un champ ouvert carré (55 x 55 x 40 cm) dont les parois sont en plexiglas opaque noir et le plancher en plexiglas transparent, sous lequel est placé un quadrillage de 25 carreaux (11 x 11 cm). Un indice visuel proximal de format A4, rayé blanc et noir, est accroché sur la face interne de la paroi droite (**Figure 26A**). Deux lampes halogènes sont placées à droite et gauche du dispositif de sorte à avoir une intensité de 15 lux au centre et 9-11 lux dans les angles. Une radio émet de la musique dont le niveau sonore au sein du dispositif doit être le même que dans l'animalerie c'est à dire environ 50 dB.

Une chaise est installée en face du champ ouvert afin que l'expérimentateur puisse observer le comportement exploratoire de la souris dans le reflet d'une paroi. Ce comportement peut également être analysé *a posteriori* grâce aux enregistrements vidéo réalisés grâce à une caméra fixée au-dessus de l'enceinte.

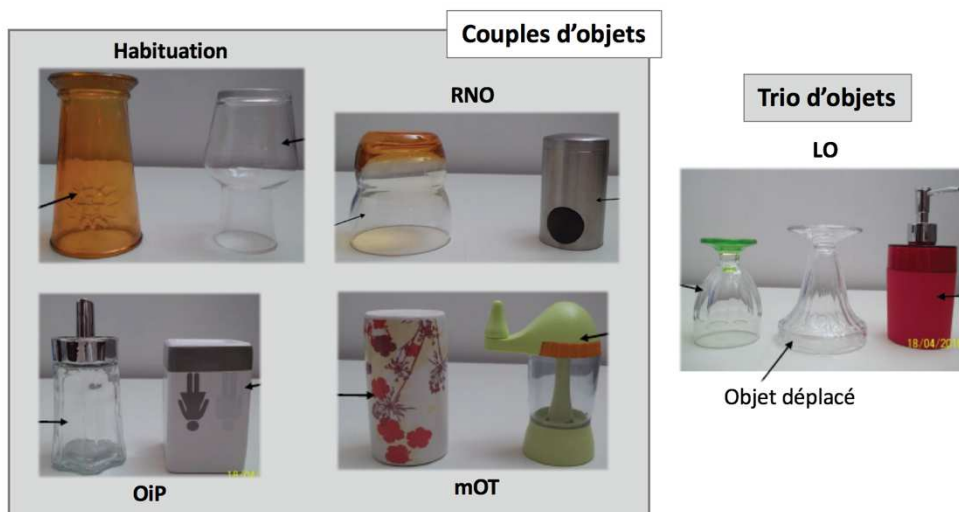


Figure 25. Objets utilisés lors des tests de mémoires de reconnaissances d'objets. Des couples d'objets sont utilisés pour l'habituation, la RNO, l'OiP et la mOT. Un triplet d'objets est utilisé pour la tâche de LO. *RNO, reconnaissance de nouvel objet ; LO, localisation d'objet ; OiP, object-in-place ; mOT, mémoire de l'ordre temporel.*

c) Protocole expérimental

Pour cette tâche les souris sont déplacées de leur cage vers le champ ouvert, et *vice-versa*, à l'aide de tubes auxquels elles sont préalablement habituées, afin de réduire le stress de la manipulation par l'expérimentateur (voir « Manipulation des souris », p. 23).

L'**exploration** est considérée lorsque la souris dirige son museau vers l'objet à une distance inférieure à 2 cm. Les comportements suivants ne sont pas considérés comme exploratoires : les escalades ou les tentatives d'escalade, les mordillements, les léchages, ou le fait de tourner autour de l'objet. Les explorations sont chronométrées manuellement par l'expérimentateur et sont en général très brèves, c'est à dire de l'ordre de quelques dixièmes de secondes. Si une souris explore moins de 2 s lors de la phase d'acquisition ou de test, elle est retirée de l'analyse. Après chaque phase d'exploration, le dispositif ainsi que les objets sont nettoyés avec de l'alcool à 35 %, puis avec de l'eau, afin de brouiller les traces olfactives. De plus tous les objets sont présents en double afin de pouvoir les alterner.

Les tests de mémoires de reconnaissances sont réalisés sur 5 jours (**Tableau 8**). Le premier jour, chaque souris est placée pour la première fois dans le champ ouvert avec deux objets non familiers : c'est le jour d'**habituation** (**Figure 26A**). La souris dispose de 10 min pour

explorer les objets et le dispositif expérimental. Elle est ensuite récupérée grâce au tube et replacée dans sa cage de stabulation en animalerie pendant 3 h, avant d'être replacée une seconde fois dans le champ ouvert. Les objets sont identiques et à la même position que lors de la phase dite « d'acquisition », par conséquent aucun des objets n'élicite de comportement exploratoire accru.

Le jour 2, les souris sont soumises au test de RNO. Durant la phase d'acquisition de 10 min, les souris explorent deux objets identiques, puis après un délai de 3 h où elles sont retournées dans leur cage en animalerie, elles sont replacées dans le champ ouvert (**Tableau 8**). Un des deux objets a été remplacé par un nouvel objet. Si la souris reconnaît l'objet familier, elle explore davantage l'objet nouveau (**Figure 26B**).

Le jour 3, les souris effectuent une tâche de LO permettant de tester la mémoire spatiale. Lors de l'acquisition LO 1, les souris explorent cette fois 3 objets. 3 h plus tard, lors de la rétention LO 2 (**Tableau 8**), un objet est déplacé. Si la souris se souvient de la configuration initiale des trois objets, elle explore plus l'objet déplacé que les deux autres (**Figure 26C**).

Le jour 4, les souris réalisent la tâche d'OiP. Les phases d'acquisition (OiP) 1 et de rétention (OiP 2) durent toutes les deux 15 min, et sont espacées d'un délai de seulement 5 min pendant lequel les souris sont replacées dans leur cage de stabulation (**Tableau 8**). Durant la phase d'acquisition, deux objets différents sont présentés. Lors de la phase de rétention, deux objets identiques sont placés aux mêmes positions que les objets de la phase d'acquisition. Ces objets sont familiers puisqu'ils constituent un doublon d'un des deux objets explorés lors de l'acquisition. En d'autres termes, un des deux objets de l'acquisition a donc été « changé », et remplacé par une copie de l'objet qui n'a pas été changé (**Figure 26D**). Si les souris explorent l'objet « changé », c'est qu'elles ont associé la mémoire de reconnaissance de l'objet et de la localisation (« quoi » et « où »), puisqu'elles reconnaissent qu'un objet familier est à un emplacement qui était occupé par un autre objet lors de l'acquisition.

Lors du jour 5, les souris effectuent la tâche de mOT. Cette tâche est un peu différente des autres car elle intègre une dimension temporelle qui n'était pas présente dans les autres

tâches. Pour cela, les souris effectuent une première acquisition de 10 min (mOT 1) lors de laquelle elles explorent deux objets identiques, puis sont replacées dans leur cage pendant 1h (**Tableau 8**). Elles effectuent ensuite une deuxième acquisition (mOT 2) pendant laquelle elles sont exposées à deux objets identiques, mais différents de ceux de la première acquisition (mOT 1). 1 h plus tard, elles effectuent alors la phase de rétention (mOT 3) au cours de laquelle elles peuvent explorer un objet de chaque phase d'acquisition (mOT 1 et mOT 2). Les objets sont placés dans les mêmes positions lors des 3 phases (**Figure 26E**). Les souris devraient explorer significativement plus l'objet qui est le plus ancien, car la trace mnésique de l'objet ancien devrait être moins forte que celle de l'objet récent (**Figure 26E**). Si les souris réussissent la tâche c'est qu'elles arrivent à se rappeler le décours temporel de la présentation des objets et donc qu'elles associent le « quoi » et le « quand ».

<i>Jour</i>	Test	Durée des phases d'acquisition et de rétention	Délai entre l'acquisition et la rétention	Nombre de souris testées/jour	Durée totale du protocole expérimental
1	Habituation	10min	3h	12	6h
2	RNO	10min	3h	12	6h
3	LO	10min	3h	12	6h
4	OiP	15min	5min	12	8h
5	mOT	10min	1h	10	7h20

Tableau 8. Caractéristiques des protocoles expérimentaux de chaque test de mémoire de reconnaissance d'objet. Les délais de 3 h ou 1 h entre les phases d'acquisition et de rétention fixent le nombre maximum de souris qu'il est possible de tester par jour. *RNO*, reconnaissance de nouvel objet ; *LO*, localisation d'objet ; *OiP*, object-in-place ; *mOT*, mémoire de l'ordre temporel.

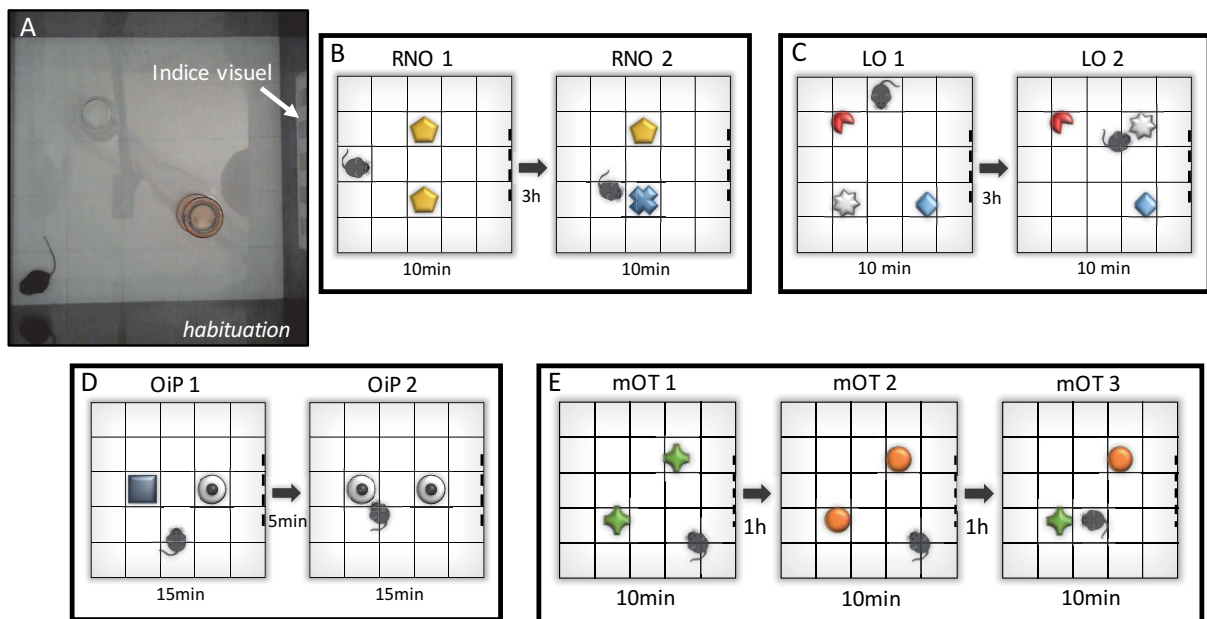


Figure 26. Dispositif et protocoles de mémoires de reconnaissances d'objets. (A) Vue du dessus du champ ouvert pendant la phase d'habituation. Un indice visuel est collé sur un des murs. Cet indice est représenté par les pointillés sur la paroi droite du champ ouvert dans les figures (B-E). (B) Reconnaissance de nouvel objet. La phase d'acquisition est appelée RNO 1 et la phase de rétention RNO 2. (C) Localisation d'objet. La phase d'acquisition est appelée LO 1 et la phase de rétention LO 2. (D) « Object-in-place ». La phase d'acquisition est appelée OiP 1 et la phase de rétention OiP 2. (E) Mémoire de l'ordre temporel. Les deux premières phases d'acquisition sont appelées mOT 1 et mOT 2, et la phase de rétention mOT 3. *RNO*, reconnaissance de nouvel objet ; *LO*, localisation d'objet ; *OiP*, object-in-place ; *mOT*, mémoire de l'ordre temporel.

6. Nesting

La construction du nid est un comportement spontané et quotidien chez la souris de laboratoire. Le nid lui permet à la fois de réguler sa température corporelle mais aussi de se cacher de la lumière et de l'Homme.

a) Dispositif et principe

Ce test est réalisé dans des cages rectangulaires (32 x 16 x 14 cm) au fond desquelles sont placés 6 rectangles de papier découpés à partir d'une feuille de ouate (**Figure 27A**), matériau avec lequel les souris confectionnent habituellement leur nid au laboratoire. La fabrication du nid est une activité spontanée chez le rongeur, effectuée pour la thermorégulation mais également pour se protéger de la lumière. Ainsi, dans cette étude, le

test du nesting a été choisi pour mimer la réalisation des activités instrumentales de la vie quotidienne chez l'Homme (Jirkof, 2014), mais il faut garder en tête qu'une atteinte motrice ou un état « dépressif-like » peut altérer cette fonction.

b) Protocole expérimental

Chaque souris est placée dans une cage avec une poignée de sa litière et les 6 rectangles de papier disposés comme illustré sur la **Figure 27A**. Ce test est effectué dans l'animalerie d'hébergement des souris. A différents délais (1 h 40, 5 h et 24 h), deux scores sont attribués à chaque souris : un score pouvant aller de 0 à 5 reflétant le nombre de zones « vides », c'est à dire celles où il n'y a plus de papier (**Figure 27B**), et un score de qualité du nid calculé selon le protocole de Gaskill et collaborateurs (Gaskill et al., 2013) (**Figure 27C**). Ce score peut prendre des valeurs allant de 0 à 20 :

- 0 : le papier n'a pas été touché du tout
- 1 : le papier a été déplacé mais qu'il n'y a pas de site identifié pour un nid
- 2 : le nid est plat, les parois du nid sont quasi inexistantes
- 3 : le nid est légèrement creusé, les parois ne sont pas très hautes
- 4 : le nid est creusé, les parois sont plutôt hautes
- 5 : le nid est fermé ou quasiment fermé, les parois cachent la souris

Au-delà d'un score de 1, il faut attribuer un score aux quatre « côtés » du nid.

Par exemple : $4 + 5 + 5 + 5 = 19$ (**Figure 27D**).

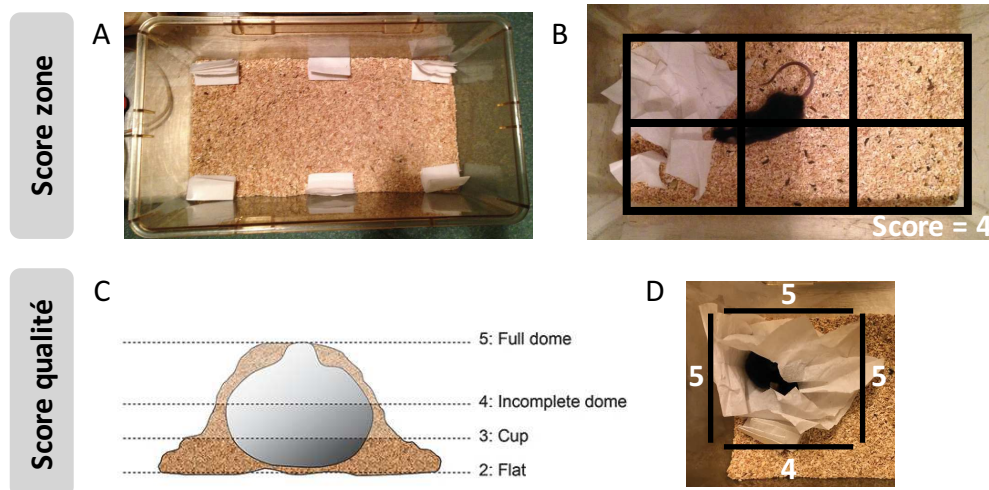


Figure 27. Attribution des scores de nesting. (A) Disposition des rectangles de papier au début du test. (B) Sur cette photographie, le score « zone » est égal à 4 car 4 zones sont vides. (C) Schéma représentant les scores relatifs à la qualité du nid. Un score est attribué à chaque « côté » en fonction de la hauteur des parois. Le score maximal est égal à 20. (D) Sur cet exemple, le score de qualité attribué est égal à 19. En réalité le score n'est pas attribué à partir de la photo car il est difficile d'estimer la hauteur des parois de cette manière. (Image en C : Gaskill et al., 2013).

7. Test de détection d'odeur : nourriture enfouie (« buried food »)

a) Dispositif et principe

Ce test repose sur la tendance naturelle des souris à utiliser les indices olfactifs pour fourrager. Il permet donc d'évaluer la capacité des souris à sentir une odeur volatile. Le dispositif de ce test consiste simplement à enfouir une nourriture appétitive dans une litière propre (environ 2 cm sous la surface), dans une cage rectangulaire (32 x 16 x 14 cm) et à chronométrer le temps mis par chaque souris pour trouver la nourriture.

b) Protocole expérimental

Ce protocole est adapté de celui de Yang et Crawley (Yang et Crawley, 2009). Pendant les deux jours d'habituation précédant le test, chaque souris reçoit une nourriture appétitive (CHOCAPIC®, Nestlé Céréales) dans sa cage de stabulation. Cette étape est importante car elle permet d'éviter un comportement de néophobie vis à vis de la nouvelle nourriture le jour du test, et également de vérifier l'intérêt des souris pour cette nourriture. Le jour du test, on prépare une cage par souris avec une hauteur de 3 cm de litière propre dans laquelle est

enfouie le Chocapic. Le chronomètre est lancé lorsque la souris est placée dans la cage, à distance de la localisation de la nourriture appétitive. On arrête le chronomètre lorsque la souris a trouvé le Chocapic. La moyenne du temps mis pour trouver la nourriture est calculée pour chaque groupe expérimental.

8. Test d'apprentissage d'un nouveau goût (« novel taste learning »)

a) Dispositif et principe

Ce test repose sur la néophobie envers une nouvelle nourriture. En effet, lorsque les souris sont exposées à une nourriture inconnue, elles ne vont pas en manger beaucoup afin de vérifier si la nourriture n'est pas nocive et donc si elle ne les rend pas malades. Si aucun effet négatif n'est entraîné par la consommation de la nourriture et que celle-ci est appétitive, la souris en mangera davantage lorsqu'elle y sera réexposée. Comme nourriture appétitive nous avons utilisé des sticks à grignoter à la luzerne pour rongeurs (McGreen®, Vitakraft®). L'ensemble du protocole est réalisé dans les cages de stabulation des souris.

b) Protocole expérimental

Ce protocole est adapté de celui de Swank et Sweatt (Swank et Sweatt, 2001). Chaque groupe de souris (WT et SNCA) est séparé en deux groupes : un groupe dit « naïf » qui ne connaît pas la nourriture, et un groupe dit « pré-exposé » qui aura été pré-exposé à la nourriture avant le test. Pendant 3 jours consécutifs, un demi stick de luzerne est placé dans chaque cage des souris du groupe « pré-exposé » (**Figure 28**). En plus d'habituer les souris à cette nourriture, on peut vérifier si elle est appétitive pour chacune d'entre elles en vérifiant si elle est mangée ou délaissée. Suite à ces 3 jours, les souris du groupe « pré-exposé » ne reçoivent pas la nourriture pendant 2 jours. Le jour du test, toutes les souris reçoivent un demi stick de nourriture (**Figure 28**), qui a été préalablement pesé à l'aide d'une balance de précision. Après 10 min, la nourriture est récupérée et chaque stick est à nouveau pesé pour évaluer la quantité de nourriture mangée (en mg) par souris.

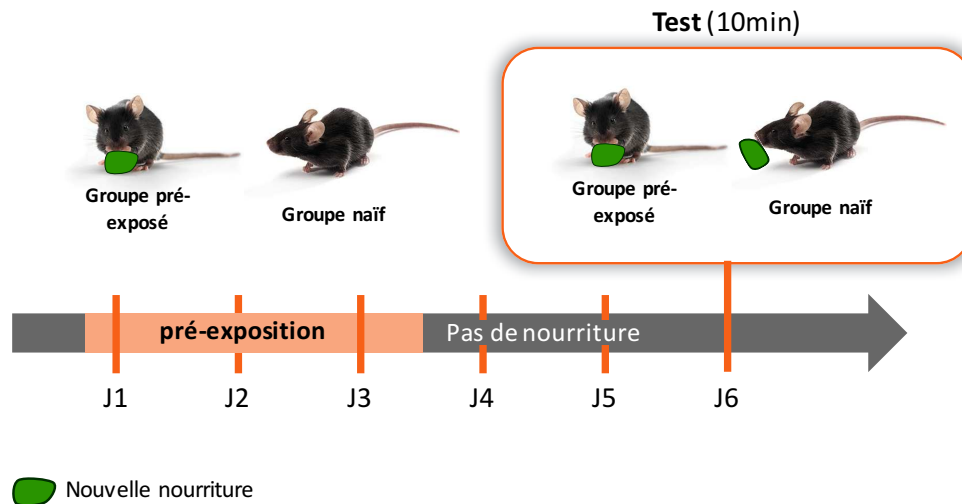


Figure 28. Protocole du test d'apprentissage d'un nouveau goût. Le groupe pré-exposé est exposé à la nourriture pendant 3 jours (J1, J2, J3) avant d'en être privé pendant 2 jours (J4 et J5). Le jour du test (J6) les souris des groupes pré-exposé et naïf sont exposées pendant 10 min à la nourriture. Celle-ci est pesée avant et après le test afin de déterminer la quantité de nourriture mangée (en mg).

9. Evaluation des troubles gastrointestinaux (constipation)

a) Dispositif et principe

La constipation chez la souris peut être évaluée par l'analyse de leurs selles. Pour cela, il est possible de collecter les selles des souris et d'évaluer leur poids mouillé et leur poids sec. Ce test se déroule dans les cages de stabulation des souris, en animalerie.

b) Protocole expérimental

Ce protocole est adapté de celui de Rota et collaborateurs (Rota et al., 2019). Chaque souris est placée dans une cage avec une litière propre pendant 1 h. Pendant ce délai, chaque selle est collectée immédiatement après expulsion et placée dans un tube fermé et unique à chaque souris. A la fin du test, le poids mouillé est mesuré à l'aide d'une balance de précision, en pesant le poids du tube rempli de selles et en y soustrayant le poids du tube vide préalablement pesé. Les tubes sont ensuite ouverts et placés à 37 °C une nuit entière. Le lendemain le poids sec est mesuré de la même manière que le poids mouillé. Une moyenne est calculée pour chaque groupe expérimental.

10. Test de franchissement de la barre

a) Dispositif et principe

Le test de franchissement de la barre permet d'évaluer la coordination motrice des souris. La barre est constituée d'une planche en bois, longue de 80 cm et large de 1 cm, sur laquelle est placée la souris. A son extrémité se trouve une plateforme rectangulaire (17 x 13,5 cm) qui donne accès à la cage de stabulation de la souris. Ce dispositif est maintenu sur un trépied à 82 cm du sol (**Figure 29A**).

b) Protocole expérimental

Le protocole se déroule sur 3 jours (**Figure 29B**). Les deux premiers jours constituent l'entraînement. Lors du premier jour d'entraînement, on commence par placer la souris à l'extrémité de la barre (opposée à la plateforme), en la maintenant par la queue si elle essaye de descendre sur les côtés de la barre. Avec l'autre main on place la cage de stabulation de la souris devant cette dernière, en la maintenant couchée sur la tranche pour donner l'impression à la souris qu'elle peut y entrer. On recule lentement la cage en direction de la plateforme pour faire avancer la souris (sans la laisser entrer). Si besoin on peut orienter la souris, et lui toucher légèrement le dos pour la faire avancer lorsqu'elle s'arrête. Lorsqu'on se rapproche de la plateforme, on pose la cage sur celle-ci et on y laisse entrer la souris. L'essai est terminé lorsque la souris place une patte avant sur la plateforme. Répéter l'opération pour chaque souris, c'est le premier essai assisté. On nettoie la barre à l'alcool à 35 % puis à l'eau entre chaque souris. On effectue 5 essais par souris. Pour les essais suivants, on ne tient plus la souris par la queue mais on peut l'orienter. Il est possible de répéter l'opération en déplaçant la cage devant la souris comme précédemment, mais généralement ce n'est pas nécessaire. L'intervalle inter-essais doit être de 30 s ou plus (passer les souris par séries de 3 par exemple). Pour les derniers essais, les souris ne devraient plus avoir besoin d'être orientées. Le second jour d'entraînement, chaque souris effectue à nouveau 5 essais comme lors du premier jour, sauf que la cage n'est pas déplacée devant la souris. Le jour 3 constitue le jour du test (**Figure 29B**). On réalise 5 essais par souris comme lors des entraînements. Cette fois, chaque essai est chronométré pour évaluer le temps moyen de traversée de la barre par souris. On peut également comptabiliser le nombre d'erreurs (glissement des pattes sur les côtés de la barre).

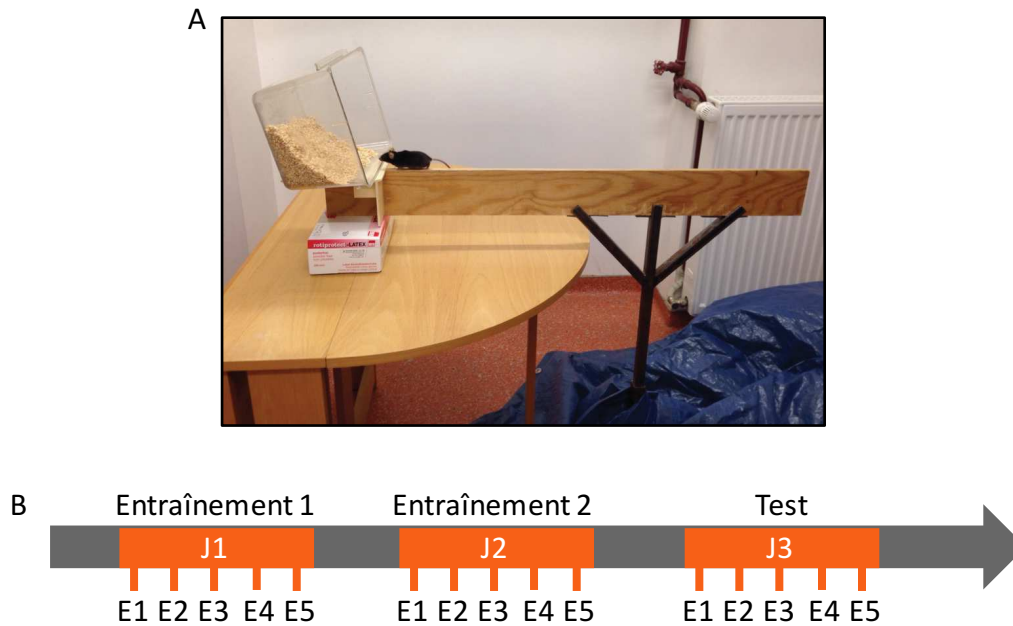


Figure 29. Protocole du test de franchissement de la barre. (A) Dispositif du test de la barre. (B) Chaque souris effectue deux jours d'entraînement et un jour de test à raison de 5 essais par jour.

D. Analyse anatomopathologique

1. Mise à mort et préparation des tissus

a) Dissection

Pour les analyses de biologie moléculaire par Western blot, les souris sont mises à mort par dislocation cervicale. Après décapitation le cerveau est rapidement extrait et les structures d'intérêt sont disséquées (cortex frontal (CF), striatum (Str), hippocampe dorsal (HD) et ventral (HV), cervelet (Cv)) et le reste du cortex (Cx) est également récupéré. Les tissus sont placés dans des tubes et plongés dans l'azote liquide afin de les congeler rapidement et éviter leur dégradation. Les échantillons sont stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

b) Perfusion intracardiaque et cryostat

Pour les immunohistochimies, le tissu cérébral doit être fixé. Les souris sont mises à mort par injection intrapéritonéale d'une dose létale de solution de pentobarbital sodique (182,2 mg/kg, Doléthal®, Vetoquinol ou 364 mg/kg, Euthasol® Vet, Le Vet. Pharma). Une

perfusion intracardiaque est ensuite effectuée, d'abord de NaCl 0,1 % pendant 3 min, puis de paraformaldéhyde (PAF) 4 % dissous dans du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) à 4 °C pendant environ 8 min pour fixer les tissus. Le cerveau est ensuite extrait et post-fixé dans du PAF 4 % durant 2 h, immergé dans une solution de saccharose 20 % durant 48 h à 4 °C afin de le cryoprotéger, et enfin congelé dans une solution d'isopentane maintenue entre -35 et -40 °C grâce à de la carboglace. Les cerveaux sont ensuite conservés à -80 °C. Des coupes frontales de 30 µm d'épaisseur sont réalisées à partir des cerveaux congelés à l'aide d'un cryostat (Microm HM560, Thermo Scientific) qui maintient la température dans l'enceinte à -20 °C ± 2 °C. Les coupes flottantes sont placées dans une solution de cryoprotection avant d'être conservées à -20 °C jusqu'à utilisation.

2. Analyse moléculaire de l'expression protéique

a) Extraction des protéines totales

Les tissus cérébraux sont lysés par dissociation mécanique et homogénéisés dans 150 µL de tampon Laemmli 1x favorisant l'extraction protéique (Laemmli 4x, Bio-Rad, dilué selon instructions) contenant du β-mercaptoéthanol (1/40^{ème} du volume total). Les échantillons sont ensuite soniqués (40 % d'amplitude, 2x 10 s, Bioblock Scientific Vibra Cell 75041) et chauffés 10 min à 70 °C et 5 min à 100 °C afin de faciliter la lyse cellulaire. Après centrifugation à 14000 g pendant 5 min, le surnageant est récupéré et conservé à -20 °C jusqu'à utilisation. Les concentrations protéiques sont mesurées avec l'appareil de quantification Qubit (Invitrogen) et le kit Qubit Protein Assay (ThermoFisher).

b) Western blot

Les gels utilisés pour le Western blot sont des gels de polyacrylamide à gradient (4 - 20 %) à 26 puits (Criterion™ TGX Stain-Free™ 4-20%, Bio-Rad). Une fois ces gels placés dans la cuve de migration (Criterion Cell, Bio-Rad) contenant le tampon de migration 1X (TG-SDS 10X, Euromedex), une quantité définie de protéines de chaque échantillon est déposée dans les puits du gel, ainsi que l'échelle de poids moléculaire (PageRuler™ Plus Prestained Protein, Thermo Scientific). L'électrophorèse est alors lancée à 200 V pendant 40 min environ. Les protéines du gel sont ensuite « activées » avec l'appareil de visualisation des gels (ChemiDoc™ Touch Imaging System, Bio-Rad) : dans le gel Stain Free se trouvent des alo-alcanes qui se

fixent sur les protéines déposées, puis sous rayonnement UV ils carboxylent les tryptophanes des protéines, émettant alors une fluorescence. Les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot® Turbo™ Midi-Size Nitrocellulose, Bio-Rad) grâce à l'appareil de transfert semi-sec (Trans-Blot® Turbo™ Transfer Starter System, Bio-Rad). Pour cela on réalise un sandwich dans la cassette de transfert, composé dans l'ordre, d'une couche de papier Whatman, de la membrane de nitrocellulose, du gel contenant les protéines, et d'une nouvelle couche de papier Whatman. Les couches de papier et la membrane ont d'abord été imbibées de tampon de transfert 1x (Trans-Blot Turbo Buffer, Bio-Rad). Une fois le sandwich formé il faut veiller à l'écraser avec un rouleau de sorte à extraire le plus possible le tampon et à le renverser. La cassette est alors placée dans l'appareil de transfert qui applique un courant de haut en bas de la cassette permettant le transfert des protéines du gel vers la membrane.

Les protéines sont alors visualisées et photographiées avec le ChemiDoc Touch. Les étapes suivantes sont toutes réalisées sous agitation. Le blocage des sites aspécifiques est réalisé en incubant la membrane dans un tampon de lavage contenant 5 % de lait en poudre (Régilait) durant 1 h à température ambiante. La membrane est ensuite incubée une nuit à 4 °C avec l'anticorps (Ac) primaire dilué (**Tableau 9**). Le lendemain, après lavage, les membranes sont incubées 1 h à température ambiante avec l'Ac secondaire (**Tableau 9**). Après une série de lavages, les protéines marquées par les Ac sont révélées par incubation de la membrane dans une solution d'ECL (« Enhanced Chemoluminescence », Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad). La réaction de chimioluminescence est visualisée avec le Chemidoc Touch. Il permet de réaliser les photos de membranes et de visualiser les bandes révélées par les Ac. Ces photos sont alors utilisées pour mesurer la densité des bandes de protéines de chaque échantillon avec le logiciel ImageLab (Bio Rad). La semi-quantification des protéines révélées est normalisée en réalisant un ratio sur la quantité totales des protéines de la membrane (photo prise directement après le transfert).

Protéine	Hôte	Dilution	Poids moléculaire	Référence
<i>α-syn totale</i>	Lapin	1/1000	14 kDa	SC-7011R, Santa Cruz
<i>α-syn pS129</i>	Lapin	1/2000	14 kDa	Ab51253, Abcam
<i>NeuN</i>	Lapin	1/1000	46 + 48 kDa	ABN78, Millipore
<i>GFAP</i>	Souris	1/2000	50 kDa	MAB360, Millipore
<i>Synaptophysine I (Syn I)</i>	Rat	1/10000	38 kDa	101011, Synaptic System
<i>PSD95</i>	Souris	1/200	95 kDa	SC-32290, Santa Cruz
<i>Neurogranine (Nrgn)</i>	Lapin	1/1000	17 kDa	SC-50401, Santa Cruz
<i>Rab 10</i>	Lapin	1/1000	23 kDa	Ab237703, Abcam
<i>Ac secondaire anti-souris couplé peroxydase</i>	Chèvre	1/2000		115035003, Jackson Immuno Research
<i>Ac secondaire anti-lapin couplé peroxydase</i>	Chèvre	1/500		111035003, Jackson Immuno Research
<i>Ac secondaire anti-rat couplé peroxydase</i>	Chèvre	1/2000		112035003, Jackson Immuno Research

Tableau 9. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les Western blots.

3. Histologie

a) Coloration au Crésyl Violet

Le crésyl violet est un composé basique qui va colorer les composés acides de la cellule, c'est à dire l'ADN (les noyaux) et l'ARN (le cytoplasme). Nous avons réalisé une coloration de coupes d'hippocampe dorsal de souris WT et SNCA âgées de 14 mois afin de réaliser une analyse de l'épaisseur des couches cellulaires de CA1, CA3, et du GD.

La solution de crésyl est préparée avec 5 g de crésyl violet acétate (Sigma C1791), 60 mL d'acétate de sodium 1 M (8,16 g / 60 mL eau distillée), 340 mL d'acide acétique 1 M (20,4 mL d'acide acétique concentré dans 340 mL d'eau distillée), le tout dilué dans 600 mL d'eau distillée. La solution est placée sur un agitateur magnétique pendant au moins 12 h avant

d'être filtrée. Une solution d'alcool et acide est préparée à partir de 10 mL d'acide acétique concentré dilués dans 200 mL d'éthanol à 95 %.

Pour réaliser la coloration, il faut chauffer le crésyl à 55 °C dans un bain-marie. Les lames sur lesquelles ont été montées les coupes de cerveau sont placées sur un portoir de lames. On réalise alors : trois bains de 3 min d'eau distillée, un bain dans le crésyl à 55 °C (9 min, agiter de temps en temps), trois bains de 3 min d'eau distillée, un bain de 3 min dans l'éthanol à 70 %, un bain de 2 min dans l'éthanol à 95 %, puis 20 s dans le mélange alcool/acide permettant de décolorer, puis un bain de 4 min dans l'éthanol à 95 %, deux bains de 4 min dans l'éthanol à 100 %, et enfin un bain de 5 min dans le xylène. Les lames sont alors montées sous lamelle avec le milieu de montage EUKITT®. Les photos ont été acquises au microscope optique (Leica DM5500B), et les mesures morphométriques ont été réalisées avec le logiciel FIJI (ImageJ). Pour ces mesures, trois niveaux d'AP ont été sélectionnés ($AP_1 = -1,58$ mm ; $AP_2 = -1,94$ mm ; $AP_3 = -2,30$ mm) pour réaliser une moyenne d'épaisseur des couches cellulaires par animal ($n = 3$ WT + 3 SNCA).

b) Immunohistochimie

Les étapes suivantes sont toutes réalisées à température ambiante sous agitation lente. Les coupes flottantes sont rincées trois fois dans du tampon phosphate salin (PBS) froid, puis placées 10 min dans une solution de peroxyde d'hydrogène 1 % pour éliminer les peroxydases endogènes. Après trois rinçages au PBS, les sites antigéniques sont bloqués en incubant les coupes 30 min dans du PBS contenant 5 % de sérum de chèvre et 0,5 % de Triton X-100. Les coupes sont alors incubées une nuit avec l'Ac primaire α -syn pS129 (fait chez le lapin, Ab51253, Abcam), dilué au $1/2000^{\text{ème}}$ dans une solution de PBS contenant 5 % de sérum de chèvre et 0,05 % de Triton X-100. Le lendemain, après plusieurs rinçages, les coupes sont incubées 1 h avec un Ac secondaire anti-lapin biotinylé (ZB-1007, Vector Laboratories), dilué au $1/500^{\text{ème}}$ dans la même solution que l'Ac primaire. Après trois rinçages au PBS, le marquage est amplifié par incubation de 45 min avec une solution d'avidine-biotine-peroxydase diluée au $1/500^{\text{ème}}$ (kit ABC Vectastain, PK-6100, Vector Laboratories). Après deux lavages au PBS et un lavage au tampon TRIS, le marquage est révélé par une incubation de 8 à 10 min avec la 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (kit DAB, SK-4100, Vector Laboratories) qui forme un précipité brun. Après trois rinçages au PBS, les coupes sont finalement montées sur lames gélatinées et laissées à sécher 24 h. Après rinçage à l'eau ultra pure et déshydratation dans des bains

d'alcool de concentrations croissantes, les lames sont plongées dans deux bains consécutifs de 5 min avec le solvant (Clarify, Medtronic) avant d'être montées sous lamelles avec le milieu d'inclusion Diamount (030400A, Diapath). Une fois sèches, les lames sont observées au microscope avec l'Apotome (Zeiss), ou visualisées et numérisées grâce à un scanner de lames (Nanozoomer Model S60, Hamamatsu).

c) Immunofluorescence

Les étapes suivantes sont toutes réalisées à température ambiante sous agitation lente. Les coupes flottantes sont rincées trois fois dans du PBS froid, puis sont incubées pendant 30 min dans une solution de blocage contenant 5 % de sérum de chèvre et 0,5 % de Triton X-100 dans du PBS. Les coupes sont alors incubées une nuit complète avec l'Ac primaire α -syn pS129 (fait chez le lapin, Ab51253, Abcam), dilué au 1/2000^{ème} dans une solution de PBS contenant 5 % de sérum de chèvre et 0,05 % de Triton X-100. Le lendemain après trois lavages au PBS, les coupes sont incubées 1 h avec l'Ac secondaire anti-lapin fluorescent (Alexa Fluor 555, Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific) dilué au 1/1000^{ème} dans la même solution de blocage que l'Ac primaire. A la fin de l'incubation, les coupes sont lavées trois fois au PBS puis montées sous lamelle avec un milieu de montage adapté à la fluorescence (Mowiol®, Sigma-Aldrich).

d) Transparisation iDISCO et immunomarquage du tissu cérébral

La transparence (ou « clearing ») permet d'imager un échantillon biologique sans réaliser de coupes, et donc observer le marquage en 3D sans avoir à passer par une reconstruction. La plupart des échantillons biologiques ont une apparence translucide blanchâtre, et c'est cela qui disperse la lumière. Tout ce qui disperse la lumière est visible. Afin de rendre le tissu transparent, il faut donc homogénéiser le tissu en équilibrant l'indice de réfraction sur l'ensemble de l'échantillon, afin que la lumière passe au travers sans être dispersée. Le iDISCO fait partie des méthodes utilisant des solvants organiques pour transpariser le tissu. La première étape de déshydratation permet d'enlever les lipides qui constituent le site majeur de l'inhomogénéité (**Figure 30A**). Après décoloration du tissu, et réhydratation, le cerveau est placé dans une solution de blocage et de perméabilisation pendant 2 à 4 jours. Le cerveau est alors incubé 2 semaines à 37 °C dans l'Ac primaire dirigé contre l' α -syn pS129 dilué au 1/2000^{ème} et une semaine également à 37 °C dans l'Ac

secondaire anti-lapin fluorescent (Cy5). L'étape de transparence a ensuite lieu dans du dibenzylether qui équilibre l'indice de réfraction du cerveau et celui du milieu (**Figure 30B**). Le cerveau ne doit alors plus être exposé à la lumière car il redeviendrait opaque et cela n'est pas réversible.

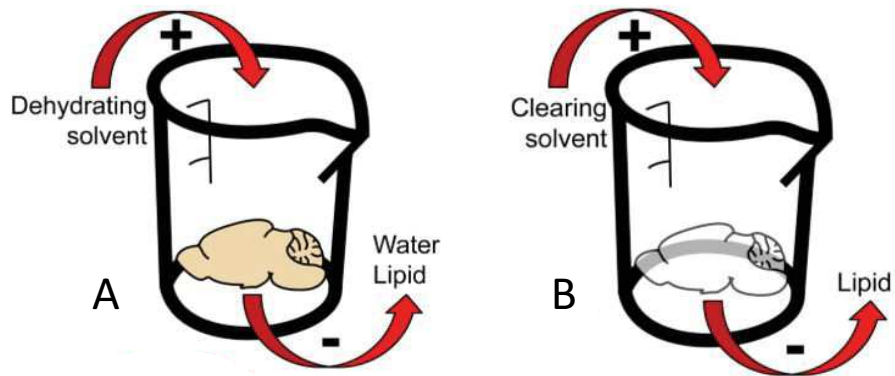


Figure 30. Transparence d'un cerveau par la méthode iDISCO. (A) L'étape de déshydratation permet de dissoudre les lipides qui constituent le site majeur d'inhomogénéité, mais le tissu n'est pas encore transparent. (B) Le cerveau est placé dans le solvant de transparence (dibenzylether) qui s'intercale dans le tissu cérébral afin d'homogénéiser l'indice de réfraction du cerveau avec celui du milieu. Image : Richardson et Lichtman, 2015.

Nous avons envoyé des cerveaux fixés et congelés à nos collaborateurs de l'institut de recherche Jean-Pierre Aubert à Lille, le Dr. Paolo Giacobini et Gaëtan Ternier, afin qu'ils soient immunomarqués et transparents. Les cerveaux proviennent de souris WT qui avaient été injectées de manière unilatérale avec des fibrilles d' α -syn, soit dans le Str (contrôle, 4 mois p.i.), soit dans le CI ant (modèle « WT FIB »). L'acquisition d'images a également été réalisée par leurs soins au microscope à feuillet de lumière (« Light Sheet Microscopy ») (LSM), Ultramicroscope 1, LaVisionBiotec).

Après l'acquisition des cerveaux transparents, un des cerveaux « contrôle Str » a été réhydraté en gradient décroissant de méthanol puis lavé au PBS, et placé pendant 12 h à 4 °C dans du sucrose à 30 %. Le lendemain, les cerveaux sont inclus dans l'OCT (Optimal Cutting Temperature compound) et congelés à l'isopentane afin d'être coupés au cryostat (coupes frontales de 30 μ m). Les coupes ont alors été comarquées par immunofluorescence avec des Ac anti-GFAP (poulet AB5541, Millipore ; souris MAB3402, Millipore (fonctionne mieux que le poulet)), et anti-NeuN (MAB377, Millipore). Les lames sont montées au Mowiol® et imagées au microscope confocal (Zeiss LSM 710).

E. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec Prism 7 (Graphpad). Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). La normalité des distributions est vérifiée avec le test de normalité de Shapiro-Wilk.

Un test t de Student a été réalisé pour la comparaison de deux groupes non appariés. Lors d'une analyse comportementale, qui nécessite un protocole répété sur plusieurs jours, il est fréquent de devoir comparer plus de 2 distributions, comme par exemple pour analyser l'apprentissage en piscine de Morris. Dans ce cas par exemple, un ANOVA à deux facteurs avec mesures répétées est réalisé, et permet d'identifier s'il y a un effet du facteur « jour », ou du facteur « génotype » sur l'apprentissage, ou s'il y a une interaction entre les deux facteurs (jour x génotype).

Afin de comparer une moyenne à un standard (pour comparer le temps d'exploration d'un objet par rapport à la chance par exemple), j'ai utilisé le test t de comparaison de moyenne à un standard.

Pour comparer plus de deux groupes expérimentaux (WT PBS, SNCA PBS, SNCA FIB par exemple), j'ai utilisé l'ANOVA à un facteur. Lorsque j'ai effectué des ANOVAs, j'ai également réalisé des comparaisons multiples avec les tests de Tukey ou de Sidak.

Lorsque les critères de normalité et/ou d'homogénéité des variances n'étaient pas respectés, des tests non paramétriques ont été utilisés. Le test de Mann-Whitney pour comparer deux groupes est utilisé à la place du test t de Student. Le test des rangs signés de Wilcoxon est utilisé pour comparer une médiane à un standard, à la place du test t de comparaison de moyenne à un standard. Le test de Kruskal-Wallis est utilisé à la place de l'ANOVA à un facteur pour la comparaison de plus de 2 groupes, et dans ce cas, les comparaisons multiples ont été effectuées à l'aide du test de Dunn. Enfin, le test de Friedman peut être utilisé comme test non paramétrique de l'ANOVA à un facteur à mesures répétées, suivi du test de comparaisons multiples de Dunn.

IV. Résultats - Partie I

L'objectif de cette première partie de ma thèse a été de caractériser le modèle Thy1-WThSNCA (SNCA). En effet, ce modèle créé par la fondation Michael J. Fox et fourni par Jackson Laboratory n'a jamais été caractérisé auparavant, outre la vérification de l'expression du transgène. Ainsi Jackson Laboratory présente ce modèle comme un modèle surexprimant l' α -syn humaine ($h\alpha$ -syn) majoritairement dans le cortex (Cx) et l'hippocampe, et pouvant être utilisé pour l'étude de la MP. Depuis la découverte de l' α -syn comme composant majeur des CL, de nombreux modèles ont été développés se basant sur l'expression de diverses formes d' α -syn sous divers promoteurs, mais la plupart de ces modèles ont été générés dans le but de développer un phénotype de type MP, et il existe à ce jour peu de modèles établis de MCL.

Le choix s'est porté sur ce modèle car l' $h\alpha$ -syn est sous forme non mutée, ainsi qu'en raison du profil d'expression diffus du transgène. Le choix de la forme humaine est associé au fait que l' α -syn murine présente naturellement la mutation A53T, ce que l'on souhaite éviter. En effet, les modèles exprimant des formes mutées de l' α -syn sont plus agressifs et présentent des déficits moteurs importants et de manière précoce, ce qui ne correspond pas à une pathologie de type MCL (voir « Modèles transgéniques de l'expression d' α -syn », p.52). D'autre part, les patients atteints de MP présentent des symptômes moteurs directement liés à une atteinte majeure du système dopaminergique. La pathologie α -syn dans la MP suit un système de propagation spécifique caractérisé par les stades de Braak (Braak et al., 2003b), et serait particulièrement importante dans la SN en début de pathologie. C'est pourquoi la plupart des modèles générés pour caractériser la MP en exprimant l' $h\alpha$ -syn ciblent la SN et/ou le Str afin de tenter de reproduire le phénotype parkinsonien. La pathologie synucléine progresse ensuite et atteint d'autres régions cérébrales, de telle sorte qu'elle affecte l'ensemble du cerveau à des stades avancés de la maladie. On sait cependant que dans la MCL, la pathologie α -syn est présente de manière diffuse et importante dans l'ensemble du néocortex à des stades précoces de la pathologie (Frigerio et al., 2011). Il est d'ailleurs pensé que c'est cette présence diffuse dans l'ensemble du cerveau, et plus particulièrement dans le néocortex et le système limbique, qui est à l'origine du phénotype cognitif de la MCL (Molano et al., 2010), et c'est pourquoi les patients atteints de MP développeraient une DP aux stades plus tardifs (Hurtig et al., 2000 ; Mattila et al., 2000).

En se basant sur cette hypothèse que l' α -syn joue un rôle causal dans le développement de la maladie, et qu'en début de pathologie les cerveaux des patients présentent une expression diffuse de la pathologie α -syn, le modèle SNCA a été choisi. La caractérisation comportementale et anatomopathologique permet de décrire le phénotype de ce modèle afin de déterminer si oui ou non il pourrait modéliser une pathologie type MCL. Plusieurs tests de différents types de mémoires, impliquant différentes structures cérébrales, ont été réalisés chez les souris SNCA afin de tester l'effet de la surexpression de l' $h\alpha$ -syn sur les performances mnésiques. Dans un second temps, nous avons évalué de manière succincte les performances motrices des souris. D'autres part, nous avons réalisé une analyse anatomopathologique visant à identifier la présence ou non d'une pathologie α -syn induite par la surexpression de l' $h\alpha$ -syn. Pour cela nous avons réalisés des analyses protéiques par Western Blots ainsi que des immunohistochimies. Les résultats de cette caractérisation réalisée chez des souris âgées de 12 à 14 mois sont présentés dans cette première partie.

A. Vérification du profil d'expression du transgène

1. Expression du transgène dans les structures cérébrales des souris SNCA

Afin de valider l'expression diffuse du transgène chez les souris SNCA à l'âge de 14 mois, nous avons réalisé une analyse semi-quantitative par Western blot du taux protéique de l' α -syn dans différentes structures cérébrales. Le Western blot réalisé pour cette analyse est représenté en **Figure 31A** et la membrane représentant les protéines totales en **Figure S1A**. Le taux protéique d' α -syn dans le CF a été choisi comme valeur de référence (100 %). L'expression d' α -syn est plus élevée dans l'HD des souris SNCA âgées de 14 mois comparé au CF (de 4,5 fois, $p < 0,001$), au Str (de 14,1 fois, $p < 0,001$) et au cervelet (de 38,6 fois, $p < 0,001$) (**Figure 31B**). Bien que son expression soit importante dans le CF, elle n'est pas significativement supérieure à celle du Str et du cervelet (respectivement $p = 0,274$ et $p = 0,109$). L'expression d' α -syn se fait sous le promoteur Thy-1 qui cible l'ensemble des neurones matures, ainsi l' α -syn est également exprimée dans le reste des structures corticales (Cx), en quantité similaire à ce qui est observé dans le Cv (**Figures S1A et S1B**).

L' α -syn est uniquement exprimée chez les souris SNCA comparé aux souris WT, comme on peut le voir en **Figure 31C** sur des Western blot réalisés sur des échantillons de CF et d'HD de souris WT et SNCA âgées de 6 mois. Le taux protéique d'actine ne diffère pas entre les WT et les SNCA, dans le CF et dans l'HD (**Figure S1G**).

2. Mesures des couches cellulaires CA1, CA3 et du GD dans l'HD

Du fait de l'expression importante d' α -syn dans l'HD, nous avons réalisé des mesures morphométriques des cornes d'ammon CA1 et CA3 et des couches ventrale (GDv) et dorsale (GDd) du gyrus denté (GD) afin de vérifier si cette expression pouvait altérer structurellement l'HD. Les épaisseurs des couches cellulaires de CA1, CA3 et du GD (**Figure 31D**) ont été mesurées chez les souris SNCA âgées de 14 mois et comparées aux souris WT du même âge. Une diminution de l'épaisseur de CA3 a pu être observée chez les souris SNCA ($p = 0,017$). Il n'y a pas de différence d'épaisseur des couches cellulaires de CA1, du GDd et du GDv entre les souris SNCA et WT ($p = 0,744$; $p = 0,282$; $p = 0,325$ respectivement).

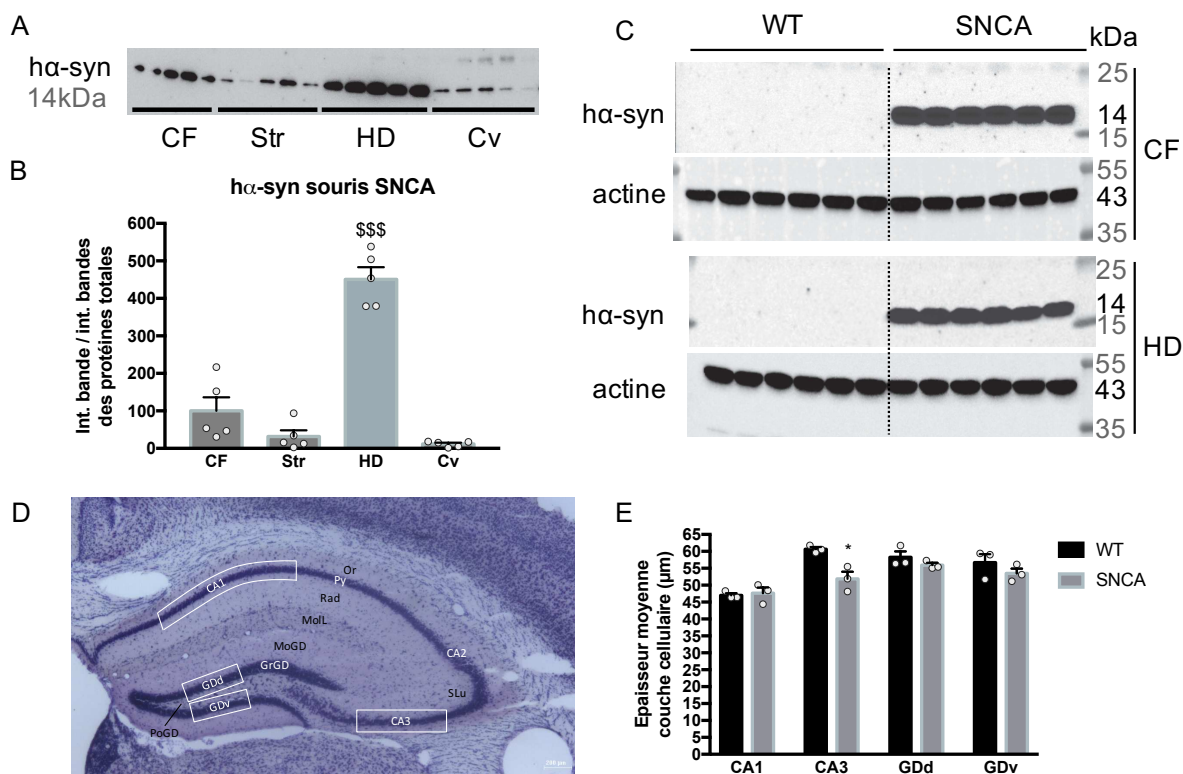


Figure 31. L' α -synucléine humaine est majoritairement exprimée dans l'hippocampe dorsal des souris SNCA âgées de 14 mois. (A) Western Blot représentatif de l' α -syn dans le CF, le Str, l'HD et le Cv de souris SNCA âgées de 14 mois (n = 5 / structure). (B) Quantification du Western blot représenté en (A) (ANOVA à un facteur : $F_{(3,16)} = 64,27$, $p < 0,001$; Test de comparaisons multiples de Tukey : CF vs Str $p = 0,274$, CF vs HD $p < 0,001$, CF vs Cv $p = 0,109$, Str vs HD $p < 0,001$, Str vs Cv $p = 0,943$, HD vs Cv $p < 0,001$). L'intensité des bandes a été corrigée par rapport aux bandes des protéines totales du blot. (C) Western blots montrant l'expression de l' α -syn uniquement dans le CF et l'HD des souris SNCA comparé aux WT à l'âge de 6 mois (n = 6 / groupe). La membrane a également été incubée avec un Ac anti-actine. (D) Coloration au crésyl violet d'une coupe frontale d'HD, montrant les régions dans lesquelles les mesures d'épaisseur de CA1, CA3 et du GD ont été réalisées (AP = -1,94mm par rapport au bregma). (E) Épaisseur moyenne des couches cellulaires de CA1, CA3, GDv et GDd de l'HD des souris WT et SNCA âgées de 14 mois, sur trois niveaux d'antéropostériorité par animal (n = 3 animaux / groupe). (Test t de Student : CA1 $p = 0,744$, CA3 $p = 0,015$, $p < 0,05$, GDd $p = 0,282$, GDv $p = 0,325$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; * $p < 0,05$ comparé aux WT, \$\$\$ $p < 0,001$ par rapport aux autres structures. CF, cortex frontal ; Str, striatum ; α -syn, α -syn humaine ; HD, hippocampe dorsal ; Cv, cervelet ; CA1, corne d'Ammon 1 ; CA3, corne d'Ammon 3 ; GDd, gyrus denté partie dorsale ; GDv, gyrus denté partie ventrale ; Or, couche oriens ; Py, couche cellulaire pyramidale ; Rad, couche radiatum ; MolL, couche moléculaire lacunosum ; GrGD, couche cellulaire granulaire du gyrus denté ; MoGD, couche moléculaire du gyrus denté ; PoGD, couche polymorphe du gyrus denté ; SLu, stratum lucidum.

B. Pathologie α -syn phosphorylée

1. Taux d'expression de l' α -syn phosphorylée sur la sérine 129

Nous avons choisi d'analyser l' α -syn phosphorylée sur la sérine 129 (α -syn pS129) par Western blot puisque celle-ci est considérée comme un marqueur des synucléinopathies. Nous avons choisi de réaliser cette analyse sur trois structures d'intérêt, à savoir le CF et l'HD qui sont (1) les structures présentant les expressions les plus importantes d' α -syn, et (2) des structures particulièrement impliquées dans la fonction mnésique, et le Str qui exprime moins d' α -syn par rapport au CF et à l'HD. De plus, le Str est une structure particulièrement affectée dans la MP, et dans l'optique de modéliser une MCL, nous voulons vérifier que cette structure n'est pas, ou peu, affectée par la pathologie α -syn.

Comme les souris SNCA surexpriment l' α -syn, elles expriment de base un niveau plus élevé d' α -syn totale comparé aux souris WT. Il est donc nécessaire de réaliser un ratio du taux d' α -syn pS129 sur le taux d'expression de l' α -syn totale. Les anticorps utilisés reconnaissent les formes murine et humaine. Les Western blots réalisés pour ces analyses sont représentés dans la **Figure 32A** et les membranes représentant les protéines totales sont visibles dans la **Figure S2**. Le niveau protéique d' α -syn totale est augmenté dans le CF, l'HD et le Str des souris SNCA comparé aux souris WT à 14 mois (de 2 fois, $p < 0,001$; de 1,7 fois, $p < 0,001$; de 2 fois $p < 0,01$ respectivement) (**Figure 32B**). On observe des résultats similaires pour le taux d'expression de l' α -syn pS129 : il est plus élevé chez les souris SNCA comparé aux souris WT dans les trois structures (de 7,7 fois dans le CF, $p < 0,001$; de 6,8 fois dans l'HD, $p < 0,001$; de 2,5 fois dans le Str, $p < 0,01$) (**Figure 32C**). Nous avons finalement réalisé un ratio du taux d'expression de l' α -syn pS129 sur celui de l' α -syn totale (**Figure 32D**) et nous avons alors observé que ce ratio était augmenté uniquement dans le CF et l'HD comparé aux souris WT (de 4,1 fois, $p < 0,001$; de 3,6 fois, $p < 0,001$). Ces résultats suggèrent la présence d'une pathologie α -syn dans le CF et l'HD des souris SNCA âgées de 14 mois.

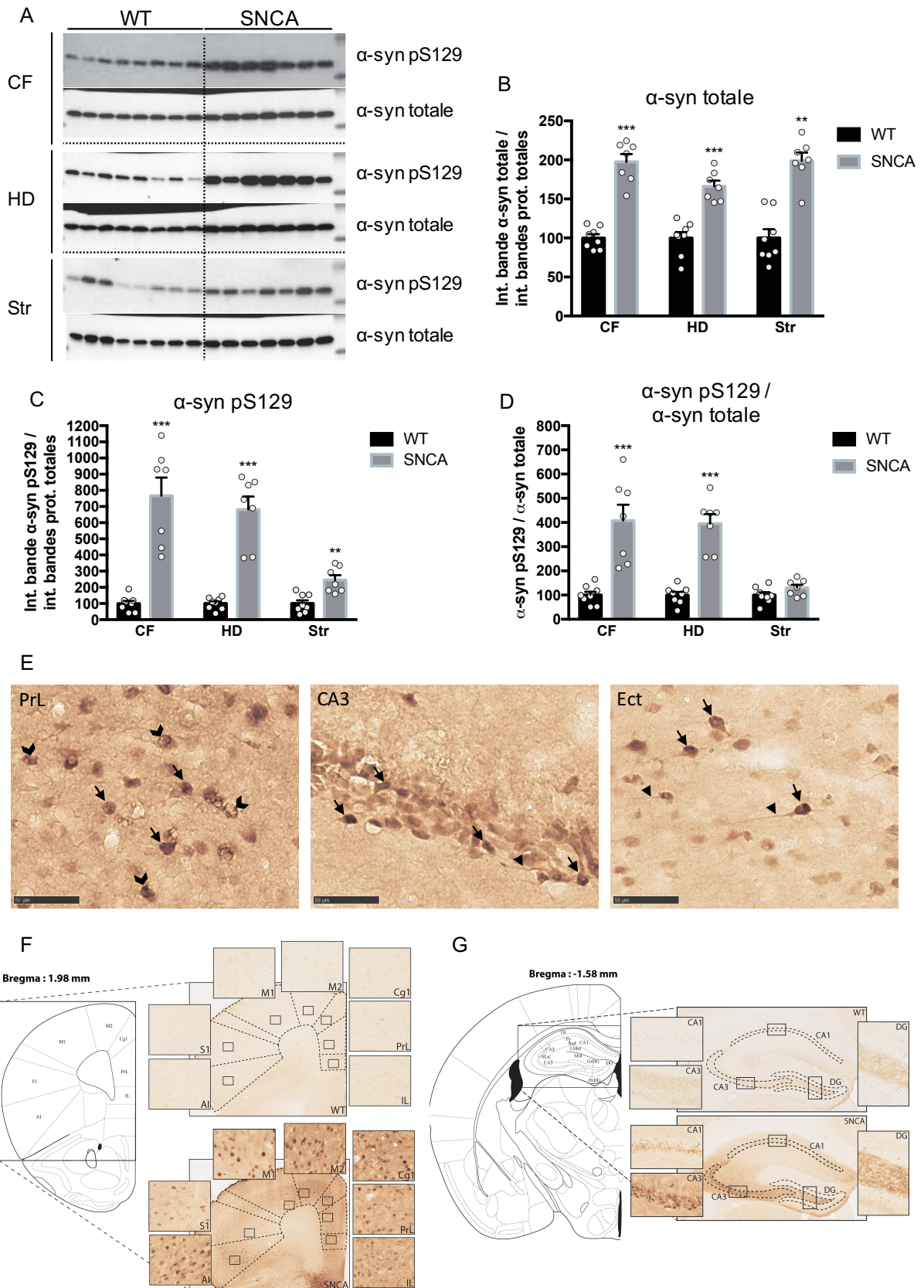
2. Marquage immunohistochimique α -syn pS129

Cette augmentation de l' α -syn pS129 chez les souris SNCA est également observable en immunohistochimie avec un marquage dirigé contre l' α -syn pS129. Les différents types d'inclusions marquées par l'anticorps dirigé contre l' α -syn pS129 sont présentés sur la **Figure**

32E : marquages de type somatique relativement homogènes (flèches) ; d'autres qui ne sont pas homogènes et apparaissent plutôt fibrillaires mais toujours somatiques (chevrons) ; et enfin des marquages de type neurite (têtes de flèches). Les marquages de type neurite font référence aux neurites de Lewy, décrits dans la littérature clinique comme étant un des trois types de dépôts pathologiques observés chez les patients atteints de synucléinopathies, avec les CL (somatiques, sphériques ou réniformes) et les « points » de Lewy (« Lewy dots ») qui sont des particules agrégées (Braak et al., 2003). Les marquages de type neurite sont présents dans les axones et les dendrites, et sont parfois aussi décrits par le terme « thread-like » car ces inclusions ressemblent en effet à des fils (Fujishiro et al., 2013). Les neurites peuvent cependant avoir des apparences variées : épais et « club-shaped » ou en forme de tire-bouchon, courts et trapus, ou longs et « thread-like » (Braak et al., 2003).

Les inclusions α -syn pS129 positives décrites sur la **Figure 32E** sont présentes dans le CF, comprenant les Cx infralimbique (IL), prélimbique (PrL), cingulaire (Cg) antérieur, moteur secondaire (M2) et insulaire agranulaire (AI), ainsi que dans les Cx somatosensoriel primaire (S1) et moteur primaire (M1) des souris SNCA, mais pas des souris WT (**Figure 32F**). Elles sont également présentes dans l'HD, et notamment dans les couches pyramidales CA3 et CA1, mais pas dans la couche granulaire du GD (**Figure 32G**). Globalement, on peut observer un marquage diffus dans l'ensemble du Cx, notamment dans les Cx insulaire (CI), périrhinal (PRh) et entorhinal latéral (EntL) (**Figure S3A**).

Figure 32. L'expression de l' α -syn pS129 est augmentée dans le CF et l'HD des souris SNCA comparé aux souris WT. (A) Western blots représentatifs de l'expression de l' α -syn pS129 et de l' α -syn totale dans le CF, l'HD et le Str de souris WT et SNCA âgées de 14 mois. (B-D) Quantification des Western blots. L'intensité des bandes a été corrigée par celle des protéines totales du même blot. (B) α -syn totale (Test t de Student : CF, HD, Str $p < 0,001$). (C) α -syn pS129 (Test de Mann Whitney : CF, HD $p < 0,001$; Test t de Student : Str $p = 0,001$, $p < 0,01$). (D) Ratio α -syn pS129/ α -syn totale (Test de Mann Whitney : CF, HD $p < 0,001$; Test t de Student : Str $p = 0,108$). (E) Immunohistochimie α -syn pS129 réalisée sur des coupes frontales de cerveau de souris SNCA âgées de 14 mois montrant des marquages somatiques homogènes (**flèches**) ou de type fibrillaire (**chevrons**), et des marquages de type neurite (**têtes de flèche**). (F, G) Immunohistochimie montrant l' α -syn pS129 dans le CF, le S1 et le M1 (E) ou l'HD (F) des souris SNCA et WT âgées de 14 mois (x10, x40). Les résultats de WB sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 8$ WT + 7 SNCA ; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparé aux WT). Echelle : 50 μ m. CF, cortex frontal ; HD, hippocampe dorsal ; Str, striatum ; AI, insula antérieur ; S1, cortex somatosensoriel primaire ; M1, cortex moteur primaire ; M2, cortex moteur secondaire ; Cg1, cortex cingulaire ; PrL, cortex prélimbique ; IL, cortex infralimbique ; Ect, cortex entorhinal.



Le noyau amygdaloïde basolatéral (BLA) est quant à lui particulièrement marqué (**Figures 33B et C**). Les structures dopaminergiques telles que le Str et la SNc ne présentent pas de marquage pour l' α -syn pS129 (**Figure S3B**). On remarque que le marquage somatique de type fibrillaire (chevrons) est uniquement présent dans des structures corticales, et pas dans les structures limbiques (HD et BLA). Les neurites constituent le marquage le moins représenté (HD et Ect).

Ces résultats indiquent la présence de diverses formes de pathologie α -syn pS129 dans de nombreuses régions corticales dont le CF, ainsi que dans deux structures limbiques dont l'HD. Aucun marquage n'a été observé dans le Str ce qui est en accord avec les résultats obtenus en Western blot.

C. Caractérisation comportementale du modèle SNCA à 12-14 mois

1. Test de la mémoire spatiale dépendante de l'HD

Nous avons testé la mémoire spatiale des souris SNCA en comparaison aux souris WT à l'âge de 12 mois grâce à deux tâches comportementales.

a) Test de la mémoire spatiale de référence en piscine de Morris

Nous avons testé la mémoire spatiale de référence grâce à la piscine de Morris avec un protocole d'apprentissage en 5 jours à raison de 4 essais par jour. Les souris WT et SNCA présentent la même vitesse de nage lors de l'étape de nage forcée qui précède l'acquisition ($p = 0,191$) (**Figure S4A**) et ne présentent pas de préférence pour le quadrant cible. En fait les souris passent moins de temps que le hasard (30s) dans le quadrant SE (WT $p = 0,012$, $p < 0,05$; SNCA $p = 0,027$, $p < 0,05$) (**Figure S4B**). Au cours de l'acquisition, la distance parcourue afin d'atteindre la plateforme diminue ($F_{(4,132)} = 32,05$; $p < 0,001$) de la même manière pour les souris WT et SNCA ($F_{(1,33)} = 1,97$; $p = 0,169$) (**Figures 33A et B**). On observe donc également une diminution de la latence d'accès à la plateforme ($F_{(4,132)} = 31,8$; $p < 0,001$) sans différence entre les souris WT et SNCA ($F_{(1,33)} = 0,043$; $p = 0,837$) (**Figure S4C**). De même, la distance parcourue en thigmotaxie, c'est à dire le fait de nager contre la paroi, diminue au fur et à mesure des jours ($F_{(4,132)} = 79,8$; $p < 0,001$), surtout entre le 1^{er} et le 2^{ème} jour d'acquisition (**Figures 33A et S4D**), sans différence entre les souris WT et SNCA ($F_{(1,33)} = 0,192$; $p = 0,664$).

Que ce soit au moment du rappel 24h ou 21j post acquisition, les souris WT et SNCA passent plus de temps que le hasard (15s) dans le quadrant cible SE ($p < 0,001$) (**Figures 33C** et **3D**). De plus, elles passent significativement plus de temps dans ce quadrant que dans les trois autres quadrants ($p < 0,001$, sauf SNCA SE vs NE 21j : $p < 0,01$) (**Figures S4E** et **F**). A 21j post acquisition, les souris SNCA passent significativement moins de temps dans le quadrant cible comparé aux souris WT ($p < 0,05$) (**Figure 33D**), de même en tenant compte du temps passé dans l'ensemble des quadrants ($p < 0,01$) (**Figure S4F**). On observe également que le nombre d'entrées dans la zone plateforme + annulus 21j post acquisition est inférieur chez les souris SNCA comparé aux souris WT avec $p = 0,059$ (**Figure S4G**) et les souris SNCA passent significativement moins de temps dans cette zone que les souris WT ($p < 0,05$) (**Figure S4H**).

b) Test de localisation d'objet

Nous avons également testé la mémoire spatiale à l'aide d'un test de localisation d'objets à un délai de rappel plus court, à savoir 3h (**Figure 33E**). Le résultat est exprimé en pourcentage de temps passé à explorer l'objet déplacé par rapport au temps total d'exploration des trois objets. Lors du test, les souris WT et SNCA explorent significativement plus l'objet déplacé comparé au hasard ($p < 0,001$) et il n'existe pas de différence entre les génotypes ($p = 0,642$) (**Figure 33F**). Lors de l'acquisition, un des objets non déplacés était exploré de manière significativement supérieure au hasard par les souris WT ($p = 0,002$, $p < 0,01$) et par les souris SNCA ($p = 0,035$, $p < 0,05$) (**Figure S4I**). Celui-ci est également exploré plus longtemps que les deux autres objets par les souris WT, et plus que l'autre objet non déplacé par les souris SNCA (**Figure S4I**). Cela n'impacte pas le test, puisqu'il n'y a pas de préférence pour l'objet déplacé. De manière globale, les souris SNCA explorent autant que les souris WT dans les deux phases de la tâche (**Figure S4J**).

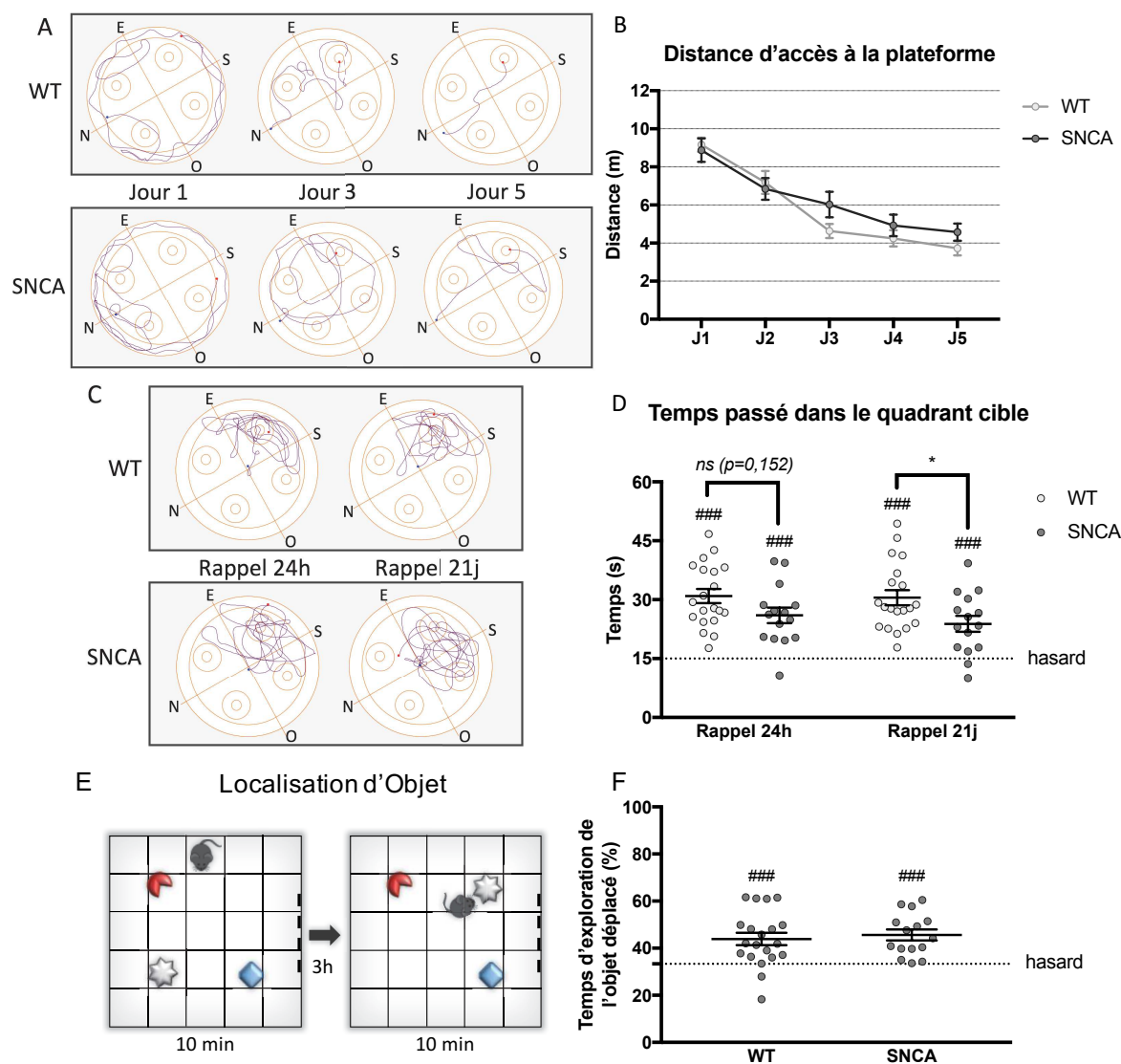


Figure 33. Les souris SNCA âgées de 12-14 mois n'ont pas de déficits majeurs dans les tâches spatiales hippocampo-dépendantes. (A) Exemples de chemins parcourus par les souris WT et SNCA aux jours 1, 3 et 5 de l'acquisition à partir du point de lâcher N. La plateforme est localisée dans le quadrant Sud-Est (SE). (B) La distance moyenne parcourue par les souris WT et SNCA pour accéder à la plateforme diminue au cours de l'acquisition (ANOVA à mesures répétées : effet jours $F_{(4,132)} = 32,05$ $p < 0,001$, pas d'effet génotype $F_{(1,33)} = 1,97$, $p = 0,169$). (C) Exemples de chemins parcourus par les souris WT et SNCA lors des tests de rappel à 24h et 21j post-acquisition. (D) Les souris WT et SNCA passent plus de temps dans le quadrant cible comparé au hasard (15s) lors des tests de rappel (ANOVA à mesures répétées : effet génotype $F_{(1,33)} = 5,89$, $p = 0,021$, $p < 0,05$; pas d'effet délai de rappel $F_{(1,33)} = 0,88$; $p = 0,356$; Test t de comparaison de moyenne à un standard (15) : 24h et 21j $p < 0,001$ pour WT et SNCA). (E) Représentation et protocole du test de localisation d'objet. (F) Temps passé à explorer l'objet déplacé, exprimé en pourcentage du temps total d'exploration. Les souris WT et SNCA passent significativement plus de temps à explorer l'objet déplacé par rapport au hasard (33 %) (Test t de comparaison de moyenne à un standard (33) : WT et SNCA $p < 0,001$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 20$ WT + 15 SNCA). * $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ comparé au hasard. N, nord ; S, sud ; E, est ; O, ouest.

2. Tests de reconnaissance d'objets

Avant de réaliser les divers tests de reconnaissance d'objets, les souris effectuent d'abord une phase d'habituation. Lors de cette phase d'habituation, le temps d'exploration total des objets ne diffère pas entre les souris WT et les souris SNCA (Hab 1, $p = 0,616$; Hab 2, $p = 0,861$) (**Figure S5A**). On observe une diminution du temps d'exploration chez les souris WT et SNCA, entre la première exposition aux objets (Hab 1) et la deuxième exposition 3h plus tard (Hab 2) ($p < 0,001$) (**Figure S5A**), ce qui est un comportement normal puisque l'environnement et les objets sont devenus familiers pour les souris.

a) Reconnaissance de nouvel objet

Lors de la tâche de reconnaissance de nouvel objet (RNO), les souris explorent deux objets identiques lors de la phase d'acquisition (RNO 1), puis l'un des objets est remplacé par un nouveau lors du test (RNO 2) qui a lieu 3h plus tard (**Figure 34A**). Lors du test, les souris WT explorent davantage le nouvel objet comparé au hasard ($p < 0,001$) (**Figure 34B**). Le pourcentage du temps d'exploration du nouvel objet par les souris SNCA ne diffère pas de celui des souris WT ($p = 0,512$), mais n'est pas significativement différent du hasard ($p = 0,077$) (**Figure 34B**). Les souris SNCA explorent autant que les WT lors de la phase d'acquisition (RNO 1, $p = 0,966$) et lors du test (RNO 2, $p = 0,747$) (**Figure S5B**). On remarque que les souris WT explorent moins de temps lors du test que lors de l'acquisition ($p = 0,016$), ce qui est un comportement normal. Lors de l'acquisition, le temps d'exploration totale est le même pour les souris, qu'elles soient exposées aux objets A ou B (**Figure S5C et D**). De plus, les souris semblent explorer autant de temps les deux objets lors de l'acquisition, indépendamment de leur position « avant » ou « arrière » dans l'enceinte carrée (**Figure S5C et E**). Pourtant si l'on évalue le pourcentage du temps d'exploration de chaque objet, en fonction de sa position, on constate que les souris WT explorent moins l'objet « avant » que l'objet « arrière » ($p = 0,047$, $p < 0,05$) (**Figure S5F**). Il est donc préférable d'évaluer le temps d'exploration en pourcentage du temps d'exploration total, lorsque ceci est possible, puisque le pourcentage d'exploration est dépendant de chaque animal. On note tout de même que les souris WT et SNCA n'explorent pas les objets différemment du hasard (50 %) selon leur position (**Figure S5F**) lors de l'acquisition de la RNO.

b) « Object-in-place »

Dans la tâche d'« object-in-place » (OiP), deux objets différents A et B sont présentés lors de l'acquisition (OiP 1), et lors du test (OiP 2) une paire d'objets est présentée, identiques tous deux à l'un des deux objets de l'acquisition, et occupant les mêmes positions que les objets lors de l'acquisition (**Figure 34C**). Lors du test, les souris WT explorent significativement plus l'objet qui a été changé par rapport au hasard ($p = 0,001$), et par rapport aux souris SNCA ($p = 0,023$; $p < 0,05$), ces dernières n'explorant pas l'objet qui a été changé différemment du hasard ($p = 0,944$) (**Figure 34D**). Lorsqu'on s'intéresse au pourcentage du temps d'exploration de chaque objet pendant l'acquisition, on constate que les souris WT explorent d'avantage l'objet A que le B ($p = 0,008$, $p < 0,01$), et les souris SNCA également, mais pas de manière significative ($p = 0,072$) (**Figure S5G**). Cependant, ni les souris WT ni les souris SNCA n'explorent les objets A ou B différemment du hasard (WT, $p = 0,067$; SNCA, $p = 0,095$) (**Figure S5G**). Ceci n'est pas problématique pour le test puisque les souris sont exposées à un doublon du même objet. Ce qui est important c'est que l'on n'observe pas de différence d'exploration liée à la position des objets « gauche » ou « droite » (**Figure S5H**). De plus, les souris SNCA explorent autant de temps que les souris WT lors de l'acquisition et lors du test (**Figure S5I**).

c) Mémoire de l'ordre temporel

Pour la tâche de mémoire de l'Ordre Temporel (mOT), il y a deux phases d'acquisition (mOT 1 et mOT 2) : comme on peut le voir sur la **Figure 34E**, deux objets différents ont été présentés à la souris en amont du test et dans un certain ordre, permettant de tester la mOT. Ces objets sont présentés par paires d'objets A ou B, comme lors de l'acquisition de la RNO. Lors du test (mOT 3), les souris WT explorent plus l'ancien objet que le récent comparé au hasard ($p = 0,029$; $p < 0,05$) et aux souris SNCA ($p = 0,011$; $p < 0,05$). Les souris SNCA n'explorent pas l'objet ancien différemment du hasard ($p = 0,186$) (**Figure 34F**). Lors de la mOT 1, les souris WT exposées à la paire d'objets B explorent plus longtemps que celles exposées à la paire d'objet A ($p = 0,46$; $p < 0,05$) (**Figure S5J**). C'est aussi le cas des souris SNCA lors de la deuxième acquisition (mOT 2) bien que cet effet ne soit pas significatif ($p = 0,054$) (**Figure S5J**).

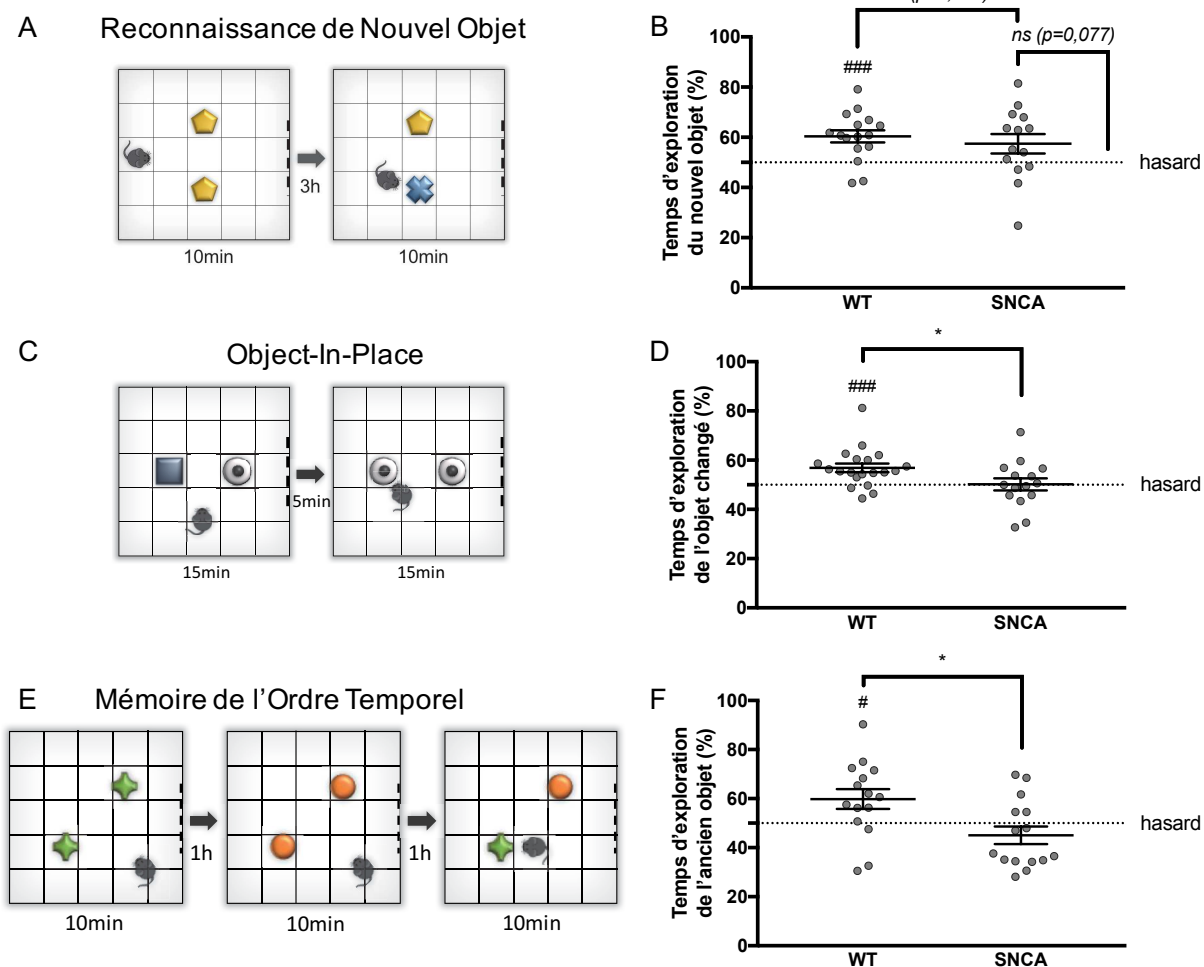


Figure 34. La mémoire de reconnaissance d'objets est partiellement affectée chez les souris SNCA âgées de 12-14 mois. (A) Représentation et protocole du test de RNO. **(B)** Les souris WT explorent significativement plus le nouvel objet comparé au hasard (50 %), ce qui n'est pas le cas des souris SNCA (Test t de Student : $p = 0,512$; Test t de comparaison d'une moyenne à un standard (50) : WT $p < 0,001$, SNCA $p = 0,077$). **(C)** Représentation et protocole du test OiP. **(D)** Les souris WT explorent significativement plus l'objet changé comparé à la chance (50 %) mais pas les souris SNCA (Test t de comparaison d'une moyenne à un standard (50) : SNCA $p = 0,944$; Test des rangs signés de Wilcoxon de comparaison d'une médiane à un standard : WT $p < 0,001$). Les souris SNCA explorent significativement moins l'objet changé comparé aux WT (Test de Mann Whitney : $p = 0,023$, $p < 0,05$). **(E)** Représentation et protocole du test de MOT. **(F)** Les souris WT explorent significativement plus l'ancien objet comparé au hasard (50 %) mais pas les souris SNCA (Test t de comparaison d'une moyenne à un standard : WT $p = 0,029$, SNCA $p = 0,1862$). Les souris SNCA explorent significativement moins l'ancien objet comparé aux WT (Test t de Student : $p = 0,011$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ((B) $n = 16$ WT + 14 SNCA, (D) $n = 20$ WT + 15 SNCA, (F) $n = 15$ WT + 15 SNCA). * $p < 0,05$; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ comparé au hasard. RNO, reconnaissance de nouvel objet ; OiP, object-in-place ; MOT, mémoire de l'ordre temporel.

Ceci suggère globalement une préférence de l'objet B par rapport au A chez les WT et une tendance pour les SNCA. Les souris SNCA explorent les objets de la même manière indépendamment de leur position (**Figure S5K**), ce qui n'est pas le cas des WT lors de la mOT 2 puisqu'elles explorent d'avantage l'objet placé à droite dans l'enceinte ($p = 0,003$, $p < 0,05$) (**Figure S5K**). Ce biais est annulé par la randomisation gauche droite de l'objet ancien. Enfin, de manière globale, les souris SNCA explorent autant que les souris WT durant les deux acquisitions et le test (**Figure S5L**). On observe une diminution du temps d'exploration par les souris WT entre la première acquisition (mOT 1) et le test (mOT 3) ($p = 0,044$, $p < 0,05$) ; ainsi que par les souris SNCA entre la première acquisition (mOT 1) et le test (mOT 3) ($p = 0,048$, $p < 0,05$) et entre la deuxième acquisition (mOT 2) et le test ($p = 0,015$, $p < 0,05$) (**Figure S5L**). Ce comportement est normal. Ces résultats semblent indiquer un déficit des souris SNCA dans cette tâche.

Cependant, afin de vérifier si la préférence de l'objet B par les souris WT, et la tendance à la préférence de l'objet B chez les souris SNCA influence le résultat du test, on vérifie le temps d'exploration de l'ancien objet selon son type A ou B lors du test (mOT 3) (**Figure S5M**). On constate que les souris WT n'explorent pas différemment du hasard l'objet A lorsqu'il est l'objet ancien ($p = 0,774$), mais explorent significativement plus l'objet B lorsqu'il est l'objet ancien ($p = 0,005$, $p < 0,001$). Cela suggère que les souris WT ne discriminent pas nécessairement l'objet ancien de l'objet récent, bien que la moitié des souris WT devant identifier l'objet A comme étant l'ancien le font (exploration $> 50\%$). De plus les souris WT n'explorent pas différemment les objets anciens A et B ($p = 0,130$). Pour les souris SNCA, on observe le même schéma, cependant même quand l'objet B est l'objet ancien, il est exploré à moins de 50 % par la moitié des souris SNCA, et n'est pas exploré différemment du hasard ($p = 0,422$). L'objet ancien A est exploré moins longtemps comparé au hasard ($p = 0,007$, $p < 0,01$), et moins que l'objet ancien B par les souris SNCA ($p = 0,036$, $p < 0,05$). Enfin, les souris WT et SNCA n'explorent pas différemment l'objet B lorsqu'il est ancien ($p = 0,169$) (**Figure S5M**). Globalement les résultats de cette analyse suggèrent qu'il y a un biais envers l'objet B chez les souris WT et SNCA, bien que ce biais ne soit significativement observé que chez les souris WT lors de la première acquisition (mOT 1). L'ensemble de ces résultats fait qu'on ne peut pas conclure sur la tâche de mOT puisqu'on ne peut pas conclure sur la capacité des souris WT à réaliser la tâche.

d) Reconnaissance de nouvel objet aux délais 5 min et 2 h 20 min

Afin de s'assurer que le déficit en RNO au délai 3 h n'interfère pas dans la réalisation des tâches d'OiP (et de MOT), nous avons réalisé deux tâches de RNO supplémentaires sur une cohorte de 9 souris SNCA aux délais 5 min (**Figure S5N**) et 2 h 20 min (**Figure S5O**). Les souris explorent significativement plus le nouvel objet comparé au hasard au deux délais (5 min $p = 0,015$, $p < 0,05$; 2 h 20 min $p < 0,001$). Les souris SNCA ne présentent donc pas de déficit de RNO après un délai de 5 min ou 2 h 20 min.

3. Capacités olfactives

Dans la tâche d'olfaction que nous avons utilisée, les souris doivent retrouver une nourriture familière appétitive enterrée 2 cm sous une litière fraîche, permettant ainsi de tester leur capacité à détecter une odeur. Un animal WT extrême a été retiré de l'analyse (temps 449 s) en utilisant la méthode ROUT d'identification de valeurs aberrantes (avec $Q = 0,5\%$). Les souris WT et SNCA mettent en moyenne respectivement 53,29 s et 57,88 s à trouver la nourriture ($p = 0,652$) (**Figure S6**). Ainsi les souris SNCA ne présentent pas de déficit majeur dans la détection d'odeur.

4. Apprentissage d'un nouveau goût

Pour la tâche de nouveau goût, on compare la quantité de nourriture mangée par les groupes naïfs et pré-exposés pour chacun des génotypes. Les souris WT et SNCA qui ont été pré-exposées 3 jours à la nourriture en consomment presque 3 fois plus que les souris du groupe naïf pour qui la nourriture est nouvelle ($p < 0,001$) (**Figure S7**). On n'observe pas de différence liée au génotype. Les souris SNCA ont donc aussi bien appris le nouveau goût que les souris WT, et présentent autant de néophobie vis à vis de la nouvelle nourriture.

5. Nesting

Nous avons également testé la capacité des souris à réaliser leur nid. Durant le test du nesting 6 morceaux de papier sont répartis dans la cage. Après plusieurs délais (1 h 40 min, 5 h et 24 h), on observe si la souris a rassemblé le papier pour attribuer un score en fonction des zones « vidées » (**Figure S8A**). Ce score n'a pas montré de différence entre les souris WT

et SNCA peu importe le délai (**Figure S8A**). Nous avons également établi un score de qualité du nid, en fonction de la hauteur des parois de la construction. Ce score n'a pas non plus mis en évidence de différence entre les souris WT et SNCA (**Figure S8B**). Ainsi les souris SNCA âgées de 12-14 mois ne présentent pas de déficit dans la confection de leur nid.

6. Activité locomotrice spontanée

L'activité locomotrice a été mesurée durant deux nuits et deux jours et n'a pas montré de différence majeure entre les souris WT et SNCA ($F_{(1,17)} = 1,803$; $p=0,1971$), si ce n'est lors de la dernière heure de la dernière nuit ($p = 0,011$, $p < 0,05$). Dans l'encart, on peut voir les déplacements moyens des souris par heure sur l'ensemble des 2 nuits et des 2 jours. Les souris WT et SNCA sont moins actives durant le jour que la nuit ($p < 0,001$), ce qui est normal puisque les souris sont des animaux nocturnes (**Figure S9**). Les souris SNCA âgées de 12-14 mois ne présentent pas d'altération de leur activité locomotrice durant le cycle nuit/jour.

7. Evaluation de la coordination motrice

La coordination motrice a été testée sur une cohorte différente âgée de 18 mois, grâce au test de la barre (**Figure S10A**). Lors du jour de test, le temps moyen mis par les souris WT et SNCA pour traverser la barre ne diffère pas (**Figure S10B**). Le nombre moyen d'erreurs, ainsi que le nombre moyen d'erreurs par pas ne diffèrent pas entre les souris WT et SNCA (**Figure S10C et D**). Ainsi la coordination motrice ne semble pas être affectée dans le modèle SNCA à 18 mois.

D. Evaluation des atteintes synaptique, neuronale et gliale des souris SNCA à 14 mois

Afin d'identifier l'effet de la surexpression de l' α -syn sur les neurones dans le modèle SNCA, nous avons choisi d'analyser les taux protéiques de certains marqueurs synaptiques, axonal, neuronal nucléaire et astrocytaire. Ces analyses ont été réalisées par Western blot à 14 mois dans le CF (**Figure 35**), ainsi que dans l'HD et le Str (respectivement **Figures S11.2 et S11.3**). Les Western blots relatifs au CF sont représentés sur les **Figures 35A et 35C**, et la **Figure**

S11.1 représente les membranes avec les protéines totales permettant de normaliser les Western blots.

1. Marqueurs synaptiques et axonal

Les marqueurs synaptiques sont des protéines présentes au niveau de la terminaison présynaptique et au niveau postsynaptique. La synaptophysine I est une protéine associée à la membrane des vésicules synaptiques. Son taux est diminué de moitié dans le CF des souris SNCA à 14 mois par rapport aux WT ($p < 0,001$) (**Figure 35B**), mais pas dans l'HD (**Figures S11.2A et G**) ou le Str (**Figures S11.3A et G**). PSD95 est une protéine de la densité postsynaptique (dans les synapses excitatrices) et la neurogranine est une protéine postsynaptique impliquée dans la potentialisation à long terme. Le taux de la PSD95 est également inférieur dans le CF des souris SNCA de 36 % par rapport aux WT ($p = 0,013$; $p < 0,05$), mais pas celui de la neurogranine ($p = 0,867$) (**Figure 35B**). Les taux protéiques de ces marqueurs postsynaptiques ne sont pas non plus réduits dans l'HD (**Figures S11.2B, C et G**) et le Str (**Figures S11.3B, C et G**).

Rab10 est une protéine participant au transport axonal et à la croissance axonale. Son taux est diminué d'environ 31 % dans le CF des souris SNCA comparé aux souris WT ($p = 0,002$; $p < 0,01$) (**Figure 35B**), mais pas dans l'HD (**Figures S11.2D et G**), ni dans le Str (**Figures S11.3D et G**, $p = 0,094$).

2. Marqueurs neuronal et glial

NeuN est une protéine neuronale nucléaire communément utilisée pour identifier les neurones. Les taux de cette protéine ne sont pas homogènes chez les souris SNCA, et on peut voir que certaines expriment NeuN en faible quantité (≤ 50 % du taux moyen des WT) par rapport à d'autres qui l'expriment beaucoup plus (>100 % du taux moyen des WT) (**Figure 35C et D**). Cette hétérogénéité induit une tendance à la diminution non significative du marqueur chez les souris SNCA par rapport aux WT ($p = 0,072$). Le taux d'expression de NeuN n'est pas modifié entre les souris WT et SNCA dans l'HD (**Figures S11.2E et H**) et le Str (**Figures S11.3E et H**). La GFAP, classiquement utilisée comme marqueur astrocytaire, est diminuée chez les souris SNCA en comparaison au taux protéique moyen exprimé par les souris WT ($p = 0,040$;

$p < 0,05$), sauf pour une souris. Cette diminution n'est pas observée dans l'HD (**Figures S11.2F et H**) ou le Str (**Figures S11.3F et H**).

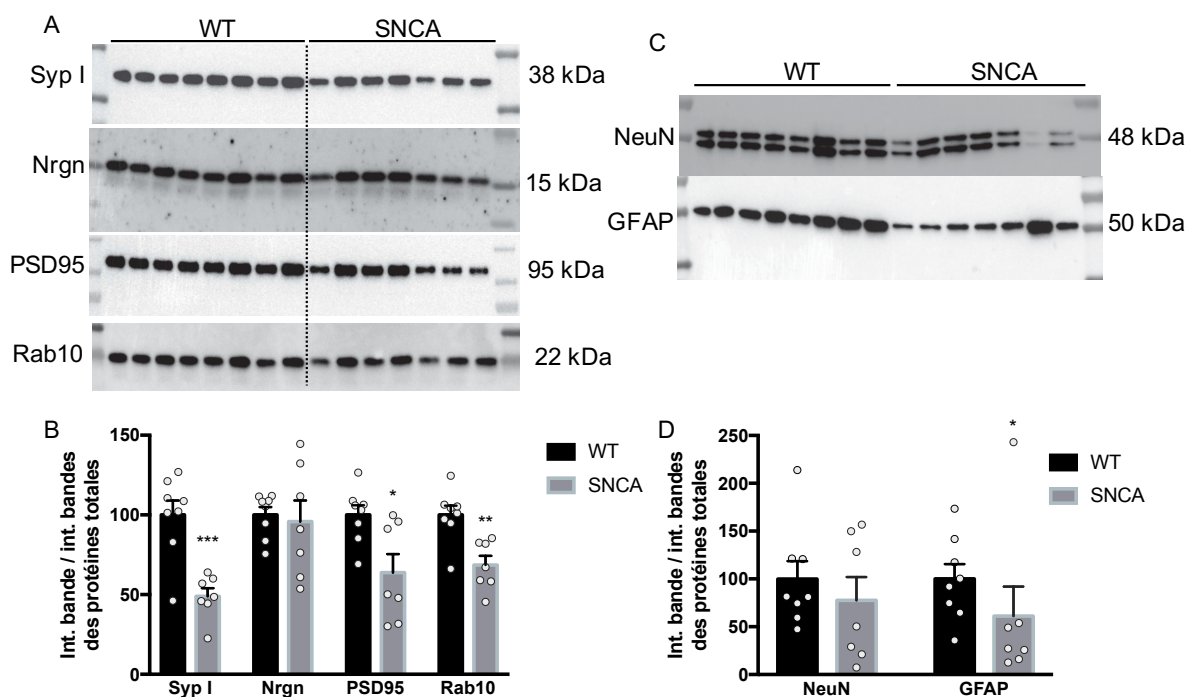


Figure 35. Plusieurs protéines synaptiques ainsi que le marqueur astrocytaire GFAP sont réduits dans le CF des souris SNCA âgées de 14 mois. (A) Western blots représentatifs comparant les taux d'expression des protéines synaptiques et axonale (Rab10) entre les souris WT et SNCA âgées de 14 mois. (B) Quantification des taux des protéines à partir des Western blots en (A) (Test t de Student : Syp I $p < 0,001$, PSD95 $p = 0,013$, $p < 0,05$, Rab10 $p = 0,002$, $p < 0,01$; Test de Mann Whitney : Nrgn $p = 0,867$). (C) Western blots représentatifs comparant les taux d'expression protéique du marqueur neuronal nucléaire NeuN et du marqueur astrocytaire GFAP entre les souris WT et SNCA âgées de 14 mois. (D) Quantification du taux protéique de NeuN et de GFAP à partir des Western Blots en (C) (Test de Mann Whitney : NeuN $p = 0,072$, GFAP $p = 0,040$, $p < 0,05$). L'intensité des bandes révélées est normalisées en faisant le rapport avec celle des protéines totales du même blot. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 8WT + 7SNCA$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparé aux WT. Syp I, synaptophysine I ; Nrgn, neurogranine ; NeuN, neuronal nucleus ; GFAP, glial fibrillary acidic protein.

V. Résultats cliniques

Les résultats de cette partie ont été obtenus dans le cadre de l'étude AlphaLewyMA menée par le Dr. Frédéric Blanc et son équipe au CHU de Strasbourg, et avec qui nous sommes en collaboration. L'étude comporte 34 sujets contrôles âgés sains (CS) et 55 patients au stade prodromal de la MCL (pro-MCL) (voir « Méthode » ci-après). J'ai réalisé les analyses statistiques des trois tests neuropsychologiques à partir des données qui ont été obtenues par l'équipe du Dr. Blanc. Je comparerai les résultats de la caractérisation des souris SNCA à ces résultats cliniques afin d'évaluer la pertinence de notre modèle.

A. Résultats de l'évaluation neuropsychologique de patients au stade prodromal de la MCL

1. Rappel Libre / Rappel Indiqué – 16 items

Le « Rappel Libre/Rappel Indiqué – 16 items » (RL/RI-16) est un test de mémoire verbale. Il comprend trois phases de rappel libre (RL) lors de laquelle les sujets doivent essayer de rappeler les 16 mots, chacun de ces rappels étant suivi d'un rappel indiqué qui leur permet de rappeler, ou non, les mots qu'ils n'ont pas cités lors du RL. Ceci permet d'obtenir un score de rappel total (RT) sur 16 (**Figure S12A**). Au total, les sujets effectuent trois essais permettant d'obtenir un score final en RL et en RT sur 48 (**Figure 36A**). Les résultats du RL/RI-16 montrent un déficit en RL chez les pro-MCL comparé aux CS (24,89 vs 30 ; $p < 0,001$), ainsi qu'en RT (43,33 vs 46,06 ; $p = 0,026$, $p < 0,05$). Dans les deux groupes, le score du RT est plus élevé que celui du RL ($p < 0,001$) signifiant que l'indication permet d'augmenter le score dans les deux groupes de sujets (**Figure 36A**). De plus, de manière globale les CS et les pro-MCL améliorent leurs scores de RL et de RT de manière significative au cours des trois rappels (**Figure S12A**), et même si les pro-MCL améliorent leur score, il reste toujours inférieur à celui des CS lors du dernier rappel (R3) (RL $p < 0,001$; RT $p = 0,005$, $p < 0,01$) (**Figure S12A**).

2. Batterie Rapide d'Efficiences Frontales

La batterie rapide d'efficiences frontales (BREF) comprend 6 tests évalués sur 3 points chacun, le score maximal étant donc 18. Les pro-MCL obtiennent un score significativement plus bas que les CS ($p < 0,001$) (**Figure 36B**).

3. Delayed Matching to Sample test – 48 items

Le « Delayed Matching to Sample test – 48 items » (DMS48) est une tâche de reconnaissance visuelle dans laquelle le sujet doit, dans un premier temps, reconnaître 48 images qui lui ont été présentées 3 min auparavant pour évaluer la reconnaissance immédiate ; puis à nouveau une heure plus tard pour la phase de reconnaissance différée. Les résultats du DMS48 montrent un déficit significatif des reconnaissances immédiate et différée

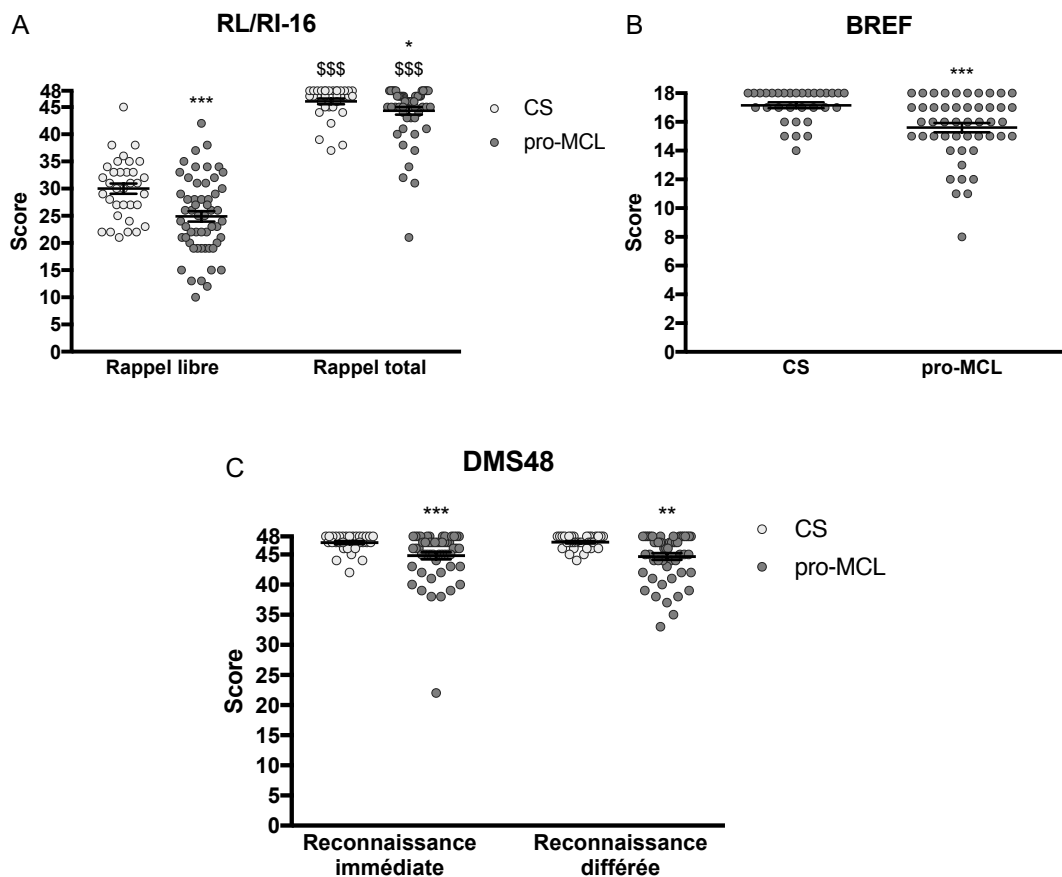


Figure 36. Les patients au stade prodromal de la MCL (pro-MCL) présentent des déficits cognitifs. (A) Les résultats du RL/RI-16 montrent un déficit plus significatif pour le rappel libre que pour le rappel total (libre + indicé) chez les pro-MCL par rapport aux contrôles sains (CS). (Test de Mann Whitney : CS vs pro-MCL, RL $p < 0,001$, RT $p = 0,026$, $p < 0,05$; RL vs RT CS et pro-MCL $p < 0,001$) (B) Les résultats de la batterie rapide d'efficacité frontale (BREF) montrent un déficit significatif chez les patients pro-MCL (Test de Mann Whitney : $p < 0,001$). (C) Les résultats du DMS48 montrent un déficit significatif de la reconnaissance immédiate et différée chez les patients pro-MCL (Test de Mann-Whitney : CS vs pro-MCL, RI $p < 0,001$, RD $p = 0,005$, $p < 0,01$; RI vs RD CS $p = 0,857$, pro-MCL $p = 0,971$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ((A) $n = 34$ CS + 55 pro-MCL, (B) $n = 32$ CS + 48 pro-MCL, (C) $n = 34$ CS + 54 pro-MCL reconnaissance immédiate / 52 pro-MCL reconnaissance différée). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparé aux CS ; \$\$\$ $p < 0,001$ comparé au rappel libre dans le même groupe expérimental. RL, rappel libre ; RT, rappel total ; RI, reconnaissance immédiate ; RD, reconnaissance différée.

chez les patients pro-MCL comparé aux CS (respectivement $p = 0,001$; et $p = 0,005$, $p < 0,01$), plus significatif pour la reconnaissance immédiate. Le score moyen de reconnaissance différée ne diffère pas de celui de reconnaissance immédiate ni pour les CS (respectivement 47,06 vs 46,96, $p = 0,857$), ni pour les pro-MCL (respectivement 44,67 vs 44,81, $p = 0,971$) (**Figure 36C**). On constate que les pro MCL mettent plus de temps que les CS à réaliser les phases d'acquisition ($p = 0,009$, $p < 0,01$) (**Figure S12B**) et de reconnaissance immédiate ($p = 0,0096$, $p < 0,01$) (**Figure S12C**).

B. Méthodologie pour l'évaluation neuropsychologique des patients pro-MCL

L'étude AlphaLewyMA a été réalisée avec la participation de **34 sujets contrôles âgés sains (CS)** et **55 patients au stade prodromal de la MCL (pro-MCL)**. Les patients ont été recrutés au Centre Mémoire de Ressources et de Recherche (CM2R) des hôpitaux universitaires de Strasbourg. Les CS ont été recrutés parmi les amis et les proches des patients, ou parmi des participants assistant au Centre d'Investigation Clinique (CIC) de l'hôpital. Les pro-MCL ont été définis comme des patients avec un déficit cognitif léger (critères de Petersen ; critères de McKeith ; critères du DSM-5). Afin d'établir les atteintes cognitives spécifiques, plusieurs tests neuropsychologiques ont été réalisés au sein de l'équipe de Pr. Blanc. J'ai réalisé les analyses statistiques de ces données en utilisant des tests non paramétriques.

1. Rappel Libre / Rappel Indiqué – 16 items

Le « Rappel Libre / Rappel Indiqué – 16 items » (RL/RI-16) est un test de mémoire verbale, basé sur l'indigage sémantique qui permet de contrôler l'encodage et de faciliter la récupération. 16 mots sont présentés et associés à un indice de catégorie sémantique. On demande aux participants de rappeler les mots lors de trois essais successifs. Chaque essai inclut un rappel libre (RL) suivi d'un rappel indiqué (RI) lors duquel l'indice sémantique est donné pour les items qui n'ont pas pu être rappelés lors du RL. En faisant la somme des scores obtenus lors du RL et du RI, on obtient le score de rappel total (RT).

2. Batterie Rapide d'Efficienc Frontale

La « Batterie Rapide d'Efficienc Frontale » (BREF) permet de tester rapidement six fonctions cognitives sous-tendues par le lobe frontal : la conceptualisation, la flexibilité mentale, la programmation motrice, la sensibilité à l'interférence, le contrôle inhibiteur et l'autonomie environnementale. 3 points sont attribués pour chaque bonne réponse, permettant d'attribuer un score maximal de 18.

3. Delayed Matching to Sample test – 48 items

Le « Delayed Matching to Sample test – 48 items » (DMS48) est un test de reconnaissance visuelle à choix forcé. La première étape est une phase d'encodage implicite pendant laquelle 48 images colorées sont présentées aux patients, et ceux-ci doivent dire pour chaque image présentée si elle contient plus ou moins de trois couleurs. Cette consigne permet de s'assurer que les sujets réalisent un traitement des caractéristiques de l'image. Après une tâche interférente d'environ 3min, un essai de reconnaissance immédiate est effectué puis un autre de reconnaissance différée, une heure plus tard. Durant ces essais, les sujets doivent reconnaître la cible d'un distracteur présenté en même temps. Un set différent de distracteurs est utilisé pour chaque essai.

VI. Discussion – Partie I

Les caractérisations comportementale et anatomopathologique du modèle SNCA âgé de 12-14 mois ont permis de mettre en évidence un déficit essentiellement frontal, sous tendu par une pathologie α -syn pS129 et une diminution de certains marqueurs synaptiques et axonal. L'HD présente également une pathologie α -syn pS129, mais semble préservé lorsque l'on analyse le comportement en lien avec l'HD en comparaison à celui en lien avec le CF. De manière intéressante, cette atteinte frontale est observée chez les patients aux stades prodromaux de la MCL, avec également une préservation de la fonction hippocampique.

A. Le modèle SNCA à 14 mois : une atteinte privilégiée du CF

1. Anatomopathologie

a) Les souris SNCA âgées de 14 mois présentent une pathologie α -syn pS129 dans le CF et l'HD

En Western blot, le CF et l'HD présentent une augmentation de l' α -syn pS129, contrairement au Str. En accord avec cela, on observe en immunohistochimie un marquage α -syn pS129 dans le CF et l'HD mais pas dans le Str. De manière intéressante, nous avons également pu observer la présence de cette pathologie de manière diffuse dans certaines structures corticales et dans une autre structure limbique, la BLA. Cette pathologie α -syn de type corticale et limbique reproduit le pattern caractéristique de la pathologie Lewy dans la MCL (Jellinger et Korczyn, 2018 ; Outeiro et al., 2019). Nous avons pu observer différents types de marquages α -syn pS129 : somatique homogène ou de type fibrillaire, et de type neurite. Ces marquages font penser à des marquages de type Lewy : les marquages somatiques pourraient être de type CL (**Figures 37C-F**), et les marquages de type neurite pourraient être de type NL (**Figures 37A et G**) (Braak et al., 2003b). Cependant, la détection de ces inclusions par l'Ac dirigé contre l' α -syn pS129 n'est pas suffisante pour conclure à une pathologie de type Lewy. Il faudrait en effet vérifier si ces marquages sont positifs pour la Thioflavine-S qui se lie spécifiquement aux feuilletts β , ou bien pour p62 ou l'ubiquitine, qui sont caractéristiques des CL (Recasens et al., 2018). Il serait également possible de réaliser un traitement à la protéinase-K pour vérifier si ces inclusions sont insolubles (Tanji et al., 2010).

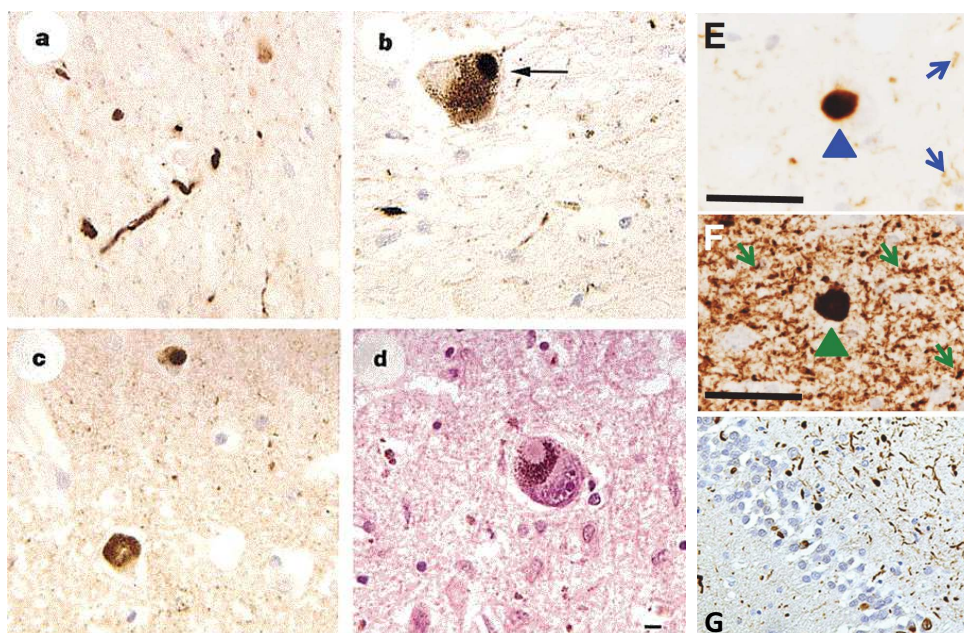


Figure 37. Marquages histopathologiques α -syn caractéristiques de la MCL et de la MP. (A-D) Tissue provenant d'un patient atteint de MCL marqué avec (A-C) un Ac dirigé contre l' α -syn humaine ou avec (D) l'hématoxyline-éosine. (A) NL dans la SN. (B) CL dans un neurone pigmenté de la SN. (C) Deux CL dans le Cx Cg. (D) CL dans un neurone pigmenté de la SN. (E, F) Tissu cortical d'un patient MCL. (E) Immunohistochimie dirigée contre l' α -syn humaine permettant d'observer un CL (tête de flèche) et des NL (flèches). (F) Immunohistochimie dirigée contre l' α -syn pS129 marquant un CL (tête de flèche), des NL et des points de Lewy (« Lewy dots ») (flèches). (G) Importante pathologie neuritique et inclusions neuronales détectées par un Ac dirigé contre l' α -syn humaine dans l'hippocampe d'un patient atteint de MP familiale. Echelle 10 μ m (A-D), 50 μ m (E-G). D'après Spillantini et al., 1997, Outeiro et al., 2019, et Fujishiro et al., 2013.

On constate que le marquage somatique de type fibrillaire que nous observons chez les souris SNCA âgées de 14 mois est présent uniquement dans les structures corticales et pas dans les structures limbiques, dans lesquelles on observe cependant le marquage somatique homogène. Cela pourrait traduire un degré de maturité différent des inclusions, mais nos marquages ne permettent pas de conclure fermement à ce sujet. En effet, grâce à l'injection intracérébrale de fibrilles préformées d' α -syn, Osterberg et collègues ont pu suivre la formation progressive d'inclusions somatiques qui subissent une maturation par compaction progressive de l' α -syn, coïncidant avec la réduction du taux d' α -syn somatique soluble. Les inclusions matures décrites dans cette étude présentent une apparence typique avec des

« jambes » qui entourent le noyau (**Figure 38**) (Osterberg et al., 2015). Osterberg et collaborateurs décrivent le marquage homogène α -syn comme un marquage soluble et normal, sans inclusions, présent également chez les souris non injectées.

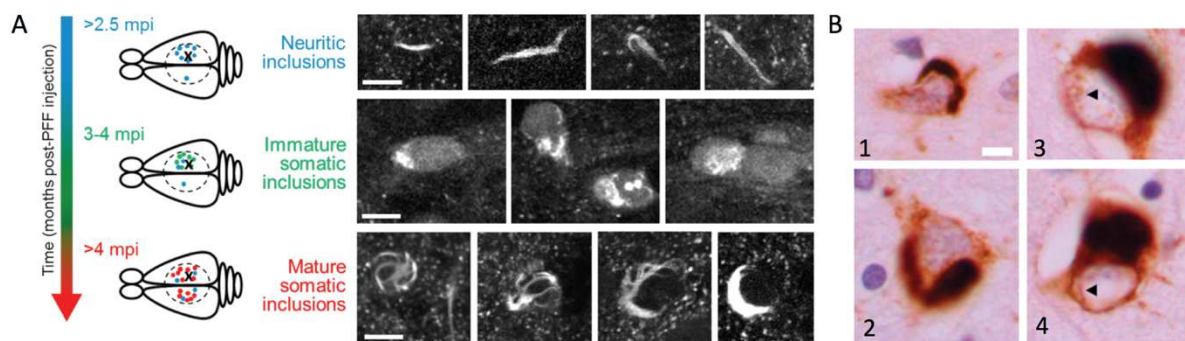


Figure 38. Maturation d'inclusions somatiques d' α -syn pS129. (A) Imagerie *in vivo* démontrant la maturation progressive d'inclusions d' α -syn dans les neurones, suite à l'injection intracérébrale de fibrilles d' α -syn murine WT chez la souris. Les souris sont transgéniques, exprimant l' α -syn humaine (taguée en Ct par l'eGFP) sous le promoteur PDGF β . A 2,5 mois p.i., on observe des marquages de type neurite. A 3-4 mois p.i., on observe un marquage somatique désorganisé, associé à marquage somatique homogène normal. A 4 mois p.i., on n'observe plus qu'un marquage somatique mature organisé (ainsi qu'un marquage neuritique), et le marquage homogène somatique (et nucléaire) n'est plus présent dans les neurones contenant les inclusions matures. (B) Neurones du CF de patients MCL détectés grâce à un Ac anti α -syn pS129, avec un contremarquage hématoxyline. En (1) et (2) on peut observer l' α -syn agrégée qui entoure le noyau similaire à certaines inclusions somatiques matures en (A). En (3) et (4), on peut observer les « jambes » de l'inclusion qui entourent le noyau, comme observé également en (A). Echelle = 10 μ m (A) ou 5 μ m (B). D'après Osterberg et al., 2015.

Ainsi, une hypothèse envisageable serait que dans les structures corticales, et spécialement dans le CF, les inclusions d' α -syn pS129 pourraient être des inclusions matures. Les marquages somatiques et homogènes seraient constitués d' α -syn soluble non agrégée. Cependant les marquages somatiques et homogènes que nous observons chez les souris SNCA dans l'HD et la BLA semblent plutôt denses et il est donc possible qu'ils consistent également en un type de marquage de CL d'aspect différent. En effet il est reporté que selon les structures cérébrales et les types neuronaux qui accumulent l' α -syn, les CL peuvent prendre des formes différentes (Outeiro et al., 2019).

b) Les souris SNCA âgées de 14 mois présentent une diminution de certains marqueurs synaptiques et axonal dans le CF

Les souris SNCA présentent une diminution du taux protéique du marqueur présynaptique synaptophysine I, ainsi que du marqueur postsynaptique PSD95, et du marqueur axonal Rab10 dans le CF uniquement. Il est admis que la diminution des marqueurs synaptiques précède généralement l'apparition de déficits cognitifs (Bereczki et al., 2016, 2018). Cette diminution pourrait être liée à une perte des synapses. En effet, si les synapses commencent à être atteintes dans une pathologie, la neurotransmission ne fonctionne plus correctement. L'élimination des synapses lors du développement cérébral ou lors de la plasticité cérébrale est un processus physiologique normal. Cependant à l'âge adulte, ce processus est reconnu comme une caractéristique précoce de la NDG (Henstridge et al., 2019). Ainsi la diminution des marqueurs synaptiques, serait en accord avec la tendance à la baisse du marqueur neuronal NeuN chez les souris SNCA, qui pourrait traduire une atteinte neuronale. La diminution des marqueurs synaptiques pourrait également être liée à la réduction de transcription des gènes codant pour ces protéines synaptiques, comme c'est le cas pour le gène SYP de la synaptophysine par exemple, qui est régulé vers le bas dans le CF de patients atteints de MCL (Santpere et al., 2018). Une diminution du taux de synaptophysine a également été observée dans le Cx visuel de patients MCL (Mukaetova-Ladinska et al., 2013). Cette hypothèse est actuellement testée dans le modèle SNCA au laboratoire.

La diminution de marqueurs synaptiques synaptophysine et PSD95 a notamment été observée dans un modèle murin conditionnel qui exprime l' α -syn A53T et qui est décrit comme un modèle de MCL (Lim et al., 2010, 2011). Dans ce modèle l'accumulation de pathologie α -syn dans le système limbique, et notamment l'hippocampe, sans former d'inclusions fibrillaires, est liée à l'apparition de troubles mnésiques, à la diminution des marqueurs synaptiques et à l'altération structurelle des synapses. En supprimant l'expression de l' α -syn chez les souris âgées, il a été observé une diminution de la pathologie α -syn dans l'hippocampe, associée à une amélioration des fonctions mnésiques et des déficits synaptiques (Lim et al., 2011).

L'altération des protéines synaptiques est également en accord avec le fait que physiologiquement l' α -syn est une protéine synaptique impliquée dans la neurotransmission, notamment via son rôle dans l'exocytose et dans le maintien du pool de vésicules synaptiques.

Ainsi une perte de fonction ou un gain de fonction toxique de l' α -syn peut avoir un impact sur le fonctionnement de la synapse.

c) Les souris SNCA âgées de 14 mois présentent une atteinte astrogliale dans le CF, et peut être neuronale

Le marqueur neuronal présente une tendance à la baisse chez les souris SNCA comparé aux WT. En effet, il y a une variabilité importante chez les SNCA, et on peut observer deux clusters avec 3 souris qui expriment des taux plus élevés de NeuN, et 4 qui expriment des taux plus faibles ($\leq 50\%$ du taux d'expression des WT). Ces résultats pourraient suggérer une neurodégénérescence dans le CF de souris SNCA âgées de 14 mois, cependant un dosage de NeuN par Western blot n'est pas suffisant. Afin d'approfondir cette hypothèse il faudrait réaliser un marquage immunohistochimique NeuN suivi d'un comptage stéréologique qui permettrait de déterminer s'il y a bien une perte neuronale dans le CF. Il est également possible d'analyser des marqueurs d'apoptose comme par exemple réaliser un dosage de la caspase-3 active, protéine participant à la cascade apoptotique, ou utiliser la méthode TUNEL (« Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling ») qui permet de mettre en évidence la fragmentation de l'ADN qui survient lors de l'apoptose. S'il s'avère qu'il y a une neurodégénérescence dans le CF des souris SNCA 14 mois, cela pourrait signifier que la perte des marqueurs synaptiques dans le CF est en fait liée à la mort neuronale.

De manière intéressante, on observe une réduction du marqueur astrocytaire GFAP dans le CF. Ceci est étonnant puisque généralement on observe plutôt une astrogliose liée à la neuroinflammation dans les pathologies neurodégénératives. Les résultats obtenus en Western blot suggèrent plutôt une perte des astrocytes dans le CF des souris SNCA âgées de 14 mois, qu'il faudrait confirmer par un comptage astrocytaire dans le CF de souris SNCA âgées de 14 mois. Une hypothèse pourrait être que de l' α -syn pathologique soit phagocytée dans les astrocytes, ce qui entrainerait leur mort, comme cela est suggéré dans les neurones. Dans la MP et dans la MCL, il a été reporté que des inclusions d' α -syn pouvait être observées dans les astrocytes (Braak et al., 2007 ; Wakabayashi et al., 2007 ; Fathy et al., 2019). D'autre part, une diminution de l'apport trophique aux neurones par les cellules gliales peut contribuer à la perte synaptique (Henstridge et al., 2019), ce qui serait en accord avec la diminution des marqueurs synaptiques dans notre modèle. Il serait donc intéressant de réaliser des co-

marquages GFAP et α -syn pS129 pour voir si les astrocytes sont affectés par la pathologie, et si cette pathologie pourrait en effet causer leur mort dans le CF des souris SNCA à 14 mois.

d) L'HD chez les souris SNCA âgées de 14 mois

Nous avons constaté que l'expression de l' α -syn est beaucoup plus importante dans l'HD que dans les autres structures cérébrales, y compris le CF. En réalisant une analyse des épaisseurs des couches cellulaires des différentes sous régions de l'HD, nous avons pu observer une réduction de l'épaisseur de la couche CA3 chez les souris SNCA comparé aux souris WT à l'âge de 14 mois. Ces informations suggèrent qu'il y aurait peut-être un lien entre la surexpression de l' α -syn humaine dans l'HD et l'atteinte de l'intégrité de la couche cellulaire CA3. Cependant, une découverte récente concernant le modèle SNCA pourrait également expliquer cette atteinte de CA3. Lors de la transgénèse, un fragment d'ADN est intégré au hasard dans le génome de la souris, ce qui peut générer une mutation si le transgène s'insère au milieu d'un gène codant. Ceci arrive dans un nombre important de lignée transgénique, et c'est le cas dans notre modèle SNCA. En effet l'insertion du transgène dans le chromosome 14 induit une duplication d'une partie de l'intron de *Slc4a7*, gène codant pour le co-transporteur de bicarbonate de sodium 3 (Goodwin et al., 2019). La duplication entraîne un knock-out (KO) fonctionnel du gène *Slc4a7* chez la souris transgénique homozygote, notre modèle SNCA étant cependant hétérozygote (jax.org). Ainsi le modèle SNCA ne possède qu'une seule copie invalidée du gène *Slc4a7* codant pour ce co-transporteur.

Le co-transporteur de bicarbonate de sodium, codé par le gène *Slc4a7*, joue un rôle important dans la régulation du pH intracellulaire qui est cruciale pour l'excitabilité neuronale. Une altération de la fonction de ce co-transporteur pourrait induire une dérégulation de l'homéostasie acido-basique, et donc un défaut de neurotransmission. Dans des neurones hippocampiques de rat, il est observé que le co-transporteur *Slc4a7* (aussi appelé NBCn1) est présent dans les corps cellulaires de CA3 et dans les dendrites proximales de la stratum lucidum, où projettent les fibres mossues provenant des cellules granulaires du gyrus denté, cellules contenant également le transporteur *Slc4a7* (Park et al., 2010). La localisation du co-transporteur a également été analysée chez la souris, où il est observé que le promoteur de *Slc4a7* est actif dans de nombreux tissu dont l'hippocampe, et particulièrement les cellules pyramidales de CA1 à CA3 (Boedtkjer et al., 2008). On ne peut donc pas exclure que le KO fonctionnel d'une partie de *Slc4a7* chez les souris SNCA hétérozygotes impacte l'excitabilité

des neurones de l'hippocampe, et que cela soit impliqué dans une diminution de l'épaisseur de la couche neuronale de CA3, c'est à dire une perte neuronale. Ceci pourrait également impacter les performances cognitives des souris SNCA. Cependant nous n'avons pas observé de déficit hippocampique chez les souris SNCA âgées de 14 mois.

2. Phénotype comportemental

a) Altération de la mémoire à long terme ancienne chez les souris SNCA âgées de 14 mois

La caractérisation comportementale du modèle SNCA à 12-14 mois a permis de mettre en évidence que les performances de rétention en mémoire à long terme ancienne en piscine de Morris étaient significativement inférieures à celles des WT. Lors de la consolidation d'un souvenir par les systèmes, la réactivation des réseaux hippocampo-corticaux créés lors de l'encodage permet de transférer la trace mnésique de l'HD vers le CF, où elle sera stockée jusqu'à ce qu'elle ait besoin d'être récupérée. Lors de la récupération du souvenir en mémoire à long terme, le réseau hippocampo-cortical est réactivé. Le déficit observé en piscine de Morris suggère donc que les souris SNCA présentent soit un déficit du CF, soit une altération du dialogue hippocampo-cortical nécessaire à la récupération du souvenir. Comme la fonction hippocampique semble être préservée lors de l'encodage spatial en piscine et en localisation d'objet, et qu'il n'y a pas de déficit de la récupération du souvenir spatial à un délai court (3h), il est plus probable que le déficit provienne du CF.

b) Déficits dans des tâches de mémoire de reconnaissance dépendantes du CPFm, du Cx EntL, et du Cx PRh

Dans les autres tâches de reconnaissances réalisées, l'HD est également plus ou moins impliqué, mais d'autres structures cérébrales sont plus particulièrement mises en jeu. En raison de la diversité des protocoles utilisées et notamment des délais appliqués entre l'acquisition et la rétention, il faut être prudent quant aux conclusions que l'on peut tirer des tests objets sur les structures impliquées (Hammond et al., 2004 ; Barker et al., 2007 ; Cohen et Stackman Jr., 2015).

Lors de la tâche de RNO, les souris SNCA n'explorent pas différemment du hasard le nouvel objet, même s'il y a une tendance. Ceci suggère un déficit dans la tâche de RNO, bien que leur

performance ne diffère pas non plus de celles des WT. La tâche de RNO, avec un délai de 3h, impliquerait plus spécifiquement le Cx PRh car il est crucial pour discriminer entre un nouvel objet et un objet familier (Barker et al., 2007). On pourrait donc conclure qu'il y a possiblement une atteinte du Cx PRh chez les souris SNCA âgées de 12-14mois. Il est important de préciser que les souris WT et SNCA explorent autant lors de l'acquisition et qu'il n'y a pas de biais envers l'un des objets. En effet, le temps d'exploration lors de l'acquisition est corrélé à la capacité de discriminer les objets lors du test. Si les souris SNCA présentent un déficit de RNO, leur capacité à effectuer les autres tests de mémoire de reconnaissance peut être impactée.

Pour la tâche d'OiP qui est un test de mémoire associative, on observe un déficit évident des souris SNCA puisqu'elles n'explorent pas l'objet cible différemment du hasard, et l'explorent significativement moins que les souris WT. Le déficit en OiP suggère une atteinte des Cx EntL et/ou PRh, et peut être également du CPFm (Chao et al., 2016). Pour ce qui est de la tâche de mOT, dépendante du CPFm et du Cx PRh (Barker et al., 2007), le biais observé envers un des objets par les souris WT et SNCA ne permet malheureusement pas de conclure. Il serait donc intéressant de reproduire cette tâche avec un couple d'objets différents.

c) Les souris SNCA ne présentent pas de déficits olfactifs ou gustatifs majeurs

Nous n'avons pas observé de déficit majeur des capacités olfactives chez les souris SNCA. L'hyposmie (baisse ou altération de l'odorat) et l'anosmie (perte totale de l'odorat) sont des affections courantes et plus ou moins précoces chez les patients atteints de certaines maladies neurodégénératives. Dans la MP, il est reconnu que le système olfactif est une des premières régions affectées (Braak et al., 2003b) et l'hyposmie est d'ailleurs considérée comme un biomarqueur précoce de la MP (Doty, 2012 ; Driver-Dunckley et al., 2014 ; Fullard et al., 2017). De plus, l'hyposmie chez les patients MP pourrait être un facteur prédictif pour le développement d'une atteinte cognitive majeure (ACM) (Baba et al., 2012). Les patients MCL sont aussi susceptibles de présenter des troubles olfactifs bien avant de développer les premiers déficits cognitifs (Chiba et al., 2012), et l'hyposmie serait plus courante et plus sévère que chez des patients atteints de MA (Chiba et al., 2012 ; Yoon et al., 2015). Nous avons donc testé les capacités olfactives pour la détection d'une odeur familière (afin d'éviter la néophobie) chez les souris SNCA âgées de 12-14 mois. Les souris ne présentent pas de déficit dans cette tâche comparé aux souris WT, suggérant que les capacités olfactives ne présentent

pas d'atteinte majeure à cet âge. Des tests olfactifs plus fins pourraient être réalisés afin d'identifier des troubles olfactifs plus subtils, comme par exemple des tests de détection d'odeur à différents seuils, ou des tests de reconnaissances d'odeur familières à différents délais (Rey et al., 2016).

L'odorat étant lié au goût, il est possible que l'anosmie soit liée à une altération des sensations gustatives. L'agueusie et l'hypogueusie désignent respectivement la perte totale et partielle de goût. De plus l'hypogueusie est également une caractéristique non motrice de la MP (Tarakad et Jankovic, 2017). Dans la tâche de nouveau goût, les souris WT et SNCA présentent une absence de néophobie vis à vis de la nourriture, ce qui témoigne de l'apprentissage du « nouveau » goût. Les souris qui n'ont pas été pré-exposées présentent une néophobie vis à vis de la nourriture. De plus, le test d'apprentissage d'un nouveau goût est sous-tendu par le cortex insulaire (CI) (Swank et Sweatt, 2001 ; Moraga-Amaro et al., 2014 ; Yiannakas et Rosenblum, 2017), qui serait une des premières régions atteintes par l'atrophie dans la MCL chez l'Homme (Blanc et al., 2014, 2015, 2016 ; Roquet et al., 2017). Cela suggère que les souris ne présentent pas d'atteinte fonctionnelle majeure du CI à 12-14 mois ou que des compensations sont en place.

d) Les souris SNCA ne présentent pas d'altération motrice majeure à 18 mois

L'intérêt de notre étude étant de caractériser le modèle SNCA afin de définir s'il peut modéliser une MCL, nous espérons que ce modèle ne développe pas de déficit moteur précoce, comme c'est le cas dans de nombreux modèles exprimant l' α -syn (Crabtree et Zhang, 2012). En effet, certains modèles de surexpression de l' α -syn humaine sous le promoteur Thy-1 murin présentent des déficits moteurs précoces (van der Putten et al., 2000 ; Rockenstein et al., 2002 ; Fleming et al., 2004). Notre modèle quant à lui ne présente pas d'altération motrice majeure à l'âge de 18 mois, alors qu'il y a déjà une atteinte cognitive, ce qui correspond à l'ordre d'apparition des symptômes cognitifs puis moteurs dans la MCL (McKeith et al., 2017).

B. Pertinence du modèle SNCA

1. Résultats neuropsychologiques de patients atteints de MCL au stade prodromal

Les patients pro-MCL présentent un déficit significatif du RL et du RT dans la tâche de RL/RI-16, classiquement lié au déficit frontal (Philippi et al., 2016). L'indiçage permet cependant d'augmenter le score des patients pro-MCL, comme celui des CS, ce qui suggère que le déficit n'est pas hippocampique. En effet, chez des patients atteints de MA souffrant d'une atteinte hippocampique, l'indiçage ne permet pas d'améliorer le score des patients (Van der Linden et al., 2004). De plus, la BREF qui permet de tester spécifiquement les déficits liés au lobe frontal (Dubois et al., 2000), a également mis en évidence des déficits frontaux chez les pro-MCL. D'autre part, les résultats du DMS48 montrent un déficit significatif plus important pour la reconnaissance immédiate que pour la différée. Ce pattern de déficit cognitif a précédemment été lié au gyrus parahippocampique, incluant les Cx Ent et PRh (Barbeau et al., 2004 ; Philippi et al., 2016). Les patients pro-MCL prennent par ailleurs plus de temps que les CS pour réaliser la phase d'encodage ainsi que celle de reconnaissance immédiate. Les déficits observés lors des phases de reconnaissance ne sont donc pas liés à une précipitation des sujets à réaliser la tâche, ou un manque de temps pour la réalisation de la tâche.

Globalement ces résultats mettent en avant un déficit essentiellement frontal chez les patients pro-MCL. Les résultats obtenus chez le modèle SNCA âgé de 12-14 mois sont en accord avec ces atteintes cognitives.

2. Le modèle SNCA : un bon modèle ?

Comme expliqué dans la partie « Les modèles animaux » (p. 49-70) de l'introduction, un modèle doit répondre à plusieurs critères à savoir : l'homologie, l'isomorphisme et la prédictivité (Dam et Deyn, 2006 ; Dawson et al., 2018). Le critère de prédictivité, au sens pharmacologique, n'a pas été abordé dans cette étude.

a) Modèle SNCA et homologie

L'homologie définit la similarité des mécanismes mis en jeu pour induire la pathologie, en d'autres termes l'étiologie de la maladie. Dans notre cas, nous nous confrontons à la première limite d'un modèle, c'est à dire que bien souvent l'étiologie de la pathologie est inconnue, et c'est notamment le cas pour la MCL.

La plupart des maladies neurodégénératives sont **sporadiques**, et ce sont souvent les formes familiales et donc génétiques qui servent de base au développement de modèles animaux, ainsi que l'identification de la protéinopathie au cœur de la pathologie. C'est exactement ce qu'il s'est passé pour la MP : à partir du moment où l' α -syn a été identifiée comme composant majeur des CL (Spillantini et al., 1997), et que des mutations ou des duplications ou triplications du gène SNCA ont été identifiées, une multitude de modèles basés sur l'expression de l' α -syn ont été développés pour la MP (Crabtree et Zhang, 2012).

Dans le cas de la MCL cependant, l'étiologie génétique est encore peu connue du fait de sa caractérisation récente, et de son sous-diagnostic. Alors que certaines études affirment que les mutations A53T ou E46K, ou la triplication du gène SNCA, sont identifiées dans des familles présentent à la fois des cas de MP et MCL (Singleton et al., 2003 ; Meeus B et al., 2012), d'autres déclarent que le décours de la pathologie clinique dans ces cas familiaux suggérés ne correspond pas à la MCL (Outeiro et al., 2019). En effet, les cas familiaux liés à une mutation du gène SNCA développent une MP à début précoce, et les cas liés à une surexpression du gène SNCA ne développent une ACM qu'à des stades tardifs, bien qu'ils présentent une distribution diffuse néocorticale de la pathologie Lewy et certaines des caractéristiques de la MCL (Outeiro et al., 2019).

Les modèles animaux exprimant l' α -syn se basent sur la pensée qu'en ciblant la pathologie α -syn dans des régions cérébrales spécifiquement impliquées dans des synucléinopathies distinctes, il est possible de reproduire les caractéristiques de la pathologie humaine. Cette idée s'appuie sur l'hypothèse controversée selon laquelle la localisation de la pathologie Lewy est liée au développement des déficits fonctionnels (cognitifs, moteurs ou sensoriels). Ainsi un modèle de MP ciblera plus spécifiquement la SN, un modèle d'AMS les oligodendrocytes du mésencéphale et du cervelet, et un modèle de MCL ciblera de manière diffuse le néocortex et les structures limbiques (Dawson et al., 2018).

D'un point de vue strictement étiologique, on ne peut pas affirmer que notre modèle SNCA remplit le critère d'homologie, puisqu'il est basé sur la surexpression de l' α -syn humaine et

que celle-ci est controversée en tant que cause de forme familiale de MCL (Singleton et al., 2003 ; Meeus B et al., 2012 ; Outeiro et al., 2019). Cependant, au niveau neuropathologique, le modèle SNCA développe la pathologie α -syn pS129 dans le CF et d'autres structures corticales, ainsi que dans l'HD et l'amygdale qui sont des structures limbiques. Il est également intéressant de noter que cette pathologie n'est pas observée dans le Str et la SN qui sont particulièrement touchée dans la MP. On peut donc dire que le modèle SNCA remplit partiellement le critère d'homologie. De plus, l'expression de la forme humaine de l' α -syn dans notre modèle est un point positif, car il est suggéré que les modèles transgéniques exprimant les formes humaines des gènes reproduisent mieux la pathologie humaine (Ericsson et al., 2013).

b) Modèle SNCA et isomorphisme

L'isomorphisme est le critère décrivant la similitude des symptômes entre le modèle et la pathologie humaine. Comme expliqué dans l'introduction, il faut garder en tête que même si la composante neuro-anatomique qui soutient la fonction neurologique testée est la même chez l'Homme et le rongeur, la manifestation des déficits peut être exprimée différemment entre les espèces. Ainsi les souris ne peuvent pas présenter exactement les mêmes symptômes que l'Homme.

Comme cela est présenté ci-dessus, les altérations comportementales observées lors de la caractérisation du modèle SNCA mettent en avant des déficits cognitifs principalement associés à une altération du CF, ainsi que des Cx PRh et EntL. Des tests neuropsychologiques réalisés sur un groupe de patients au stade prodromal de la MCL (étude AlphaLewyMA) ont permis de mettre en évidence une atteinte des mêmes structures. De manière intéressante ces résultats mettent en avant un déficit frontal, mais une fonction hippocampique préservée, comme c'est le cas dans notre modèle SNCA. De plus, les souris SNCA ne présentent pas d'atteinte motrice à 18 mois, et donc pas non plus à 12-14 mois. Dans la MCL le syndrome parkinsonien n'apparaît pas avant les déficits cognitifs et apparaît au moins un an après le début du déclin cognitif (McKeith et al., 2017).

Etant donné que les symptômes traduisent des altérations fonctionnelles de structures cérébrales, le modèle SNCA à 12-14 mois répond plutôt bien au critère d'isomorphisme pour la modélisation d'une MCL au stade prodromal.

Pour conclure, le modèle SNCA âgé de 12-14 mois présente d'une part une pathologie α -syn pS129 importante dans le CF et l'HD, ainsi que dans d'autres structures corticales et dans l'amygdale, ce qui correspond au pattern de la pathologie Lewy dans la MCL. D'autre part, il présente une altération au moins fonctionnelle du CF, avec une préservation de l'HD, ce qui est également observé chez des patients au stade prodromal de la MCL. Ainsi les souris SNCA pourraient être utilisées comme modèle de la MCL prodromale.

VII. Résultats – Partie II

Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons voulu générer un modèle de MCL plus sévère que le modèle SNCA. Pour cela nous avons décidé de suivre une stratégie basée sur des caractéristiques récemment décrites dans la pathologie humaine.

De récentes études d'imagerie cérébrale ont montré que l'insula antérieure serait une des premières régions altérées chez les patients atteints de MCL (Blanc et al., 2014, 2015, 2016 ; Roquet et al., 2017). Des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre si et comment l'insula est impliquée dans le développement de cette pathologie. Nous avons décidé de générer un nouveau modèle de MCL en ciblant le cortex insulaire (CI). L'insula est une région corticale hautement connectée à d'autres structures cérébrales corticales (comme le CPF, le Cx somatosensoriel et le Cx moteur) et subcorticales (majoritairement le Str, l'amygdale et le thalamus) et très souvent de manière réciproque (Gogolla, 2017 ; Namkung et al., 2017b ; Gehrlach et al., 2020). Du fait de cette connectivité, la partie antérieure du cortex insulaire (CI ant) est particulièrement impliquée dans l'intégration des informations autonomes et viscérales dans les fonctions émotionnelles, motivationnelles et cognitives (Namkung et al., 2017b).

Ainsi, le modèle que nous avons généré a été conçu en injectant bilatéralement des fibrilles d' α -syn humaine non mutée ($h\alpha$ -syn) dans le CI ant de souris SNCA (modèle décrit dans la première partie de cette thèse et qui surexprime l' $h\alpha$ -syn). Ces fibrilles sont obtenues dans le cadre d'une collaboration avec les Dr. R. Melki et L. Bousset (Institut des Neurosciences de Paris-Saclay). 7 mois post injection (p.i.), lorsque les souris ont atteint l'âge de 12 mois, nous avons alors réalisé une caractérisation comportementale similaire à celle réalisée chez les souris SNCA âgées de 12 à 14 mois, qui présentaient alors des troubles cognitifs fronto-dépendants. Après mise à mort de ces souris, la propagation des fibrilles a été analysée grâce à un immunomarquage dirigé contre l' α -syn pS129, considérée comme un marqueur des synucléinopathies.

En parallèle, nous avons également injecté des fibrilles d' $h\alpha$ -syn de manière unilatérale dans le CI ant de souris WT mises à mort 7 et 12 mois p.i. afin d'étudier la propagation de la pathologie à partir de cette structure, puisque ceci n'a jamais été fait auparavant. En effet, les études de propagation dans le cadre des synucléinopathies ciblent préférentiellement des structures telles que le Str et la SN, ou l'hippocampe (Luk et al., 2012b, 2012a ; Masuda-

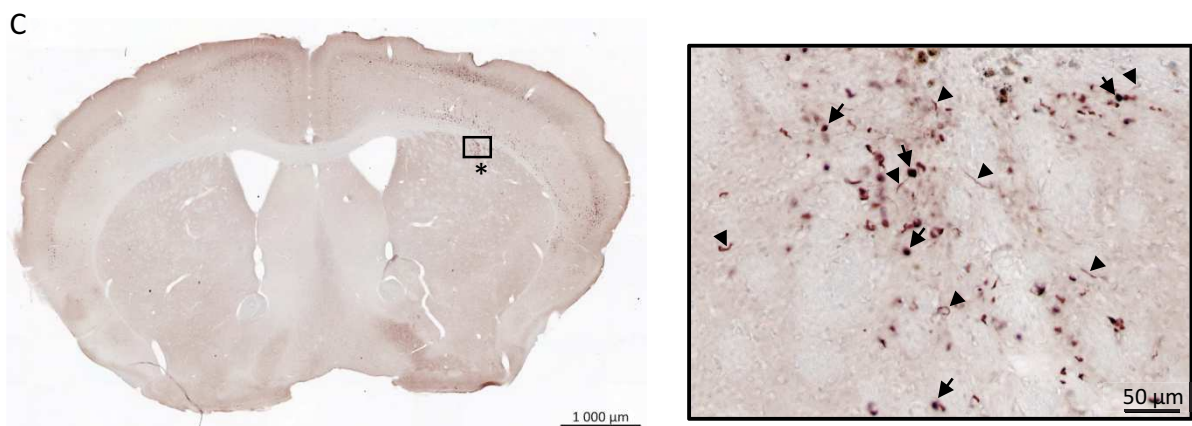
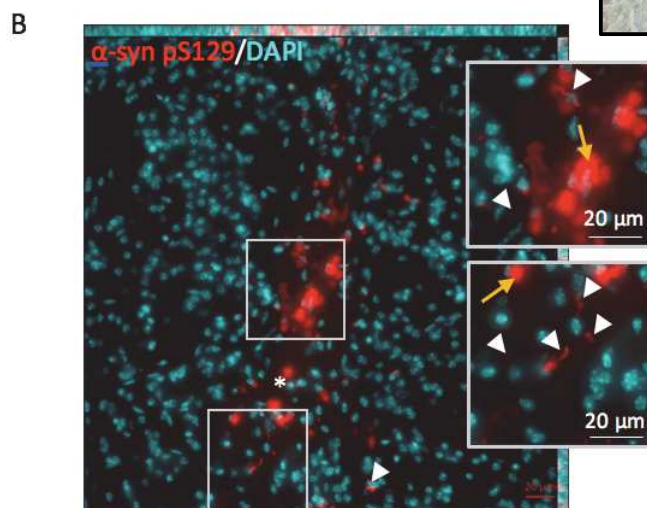
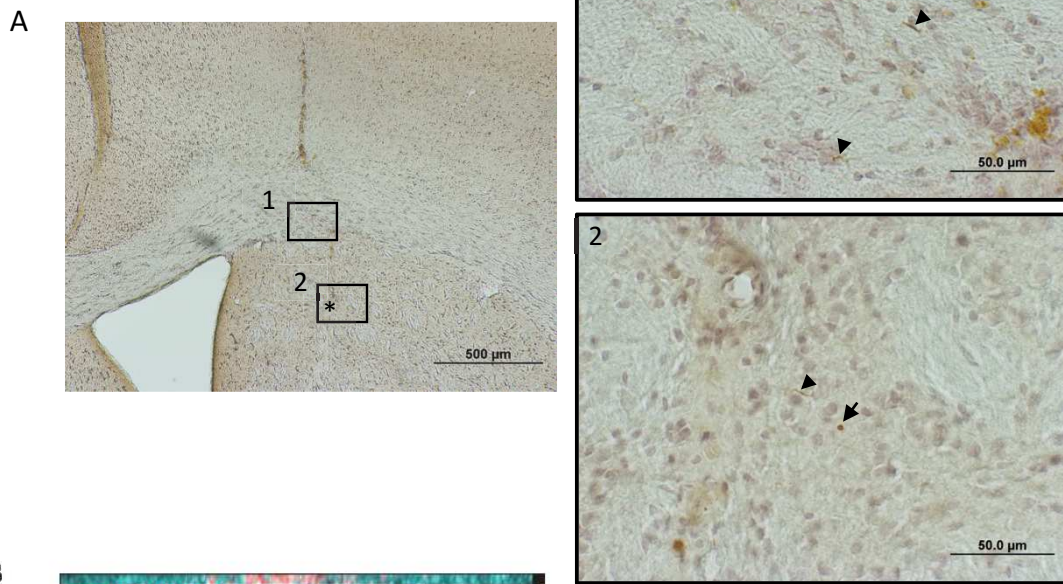
Suzukake et al., 2013 ; Recasens et al., 2014 ; Sacino et al., 2014 ; Hu et al., 2016 ; Nouraei et al., 2018 ; Stoyka et al., 2019).

Les résultats de ces deux axes de travail sont présentés dans cette seconde partie, en commençant par une description de la mise au point des injections stéréotaxiques dans le CI ant.

A. Mise au point des injections stéréotaxiques de fibrilles d'hα-syn

1. Vérification de la capacité des fibrilles à entraîner une pathologie α-syn dans le striatum dorsal

Afin de vérifier la capacité des fibrilles d'hα-syn à induire une pathologie α-syn dans nos conditions d'injection, nous avons injecté des fibrilles dans le Str de souris WT, comme cela a déjà été fait dans plusieurs études (voir « Modèles par injections d'α-syn pathogène », p. 53-57). Ainsi nous utilisons un anticorps (Ac) dirigé contre l'α-syn pS129 pour détecter l'induction de la pathologie, puisque c'est un marqueur de synucléinopathies. De plus, les fibrilles injectées étant non phosphorylables, elles ne peuvent être marquées par l'Ac anti α-syn pS129, et nous sommes sûrs de détecter la neuropathologie endogène. Nous avons pu observer l'induction de la pathologie à proximité du site d'injection dès 55 jours p.i. (**Figures 39A et B**), et à 4 mois p.i. (**Figure 39C**). Les inclusions observées sont soit de type neurite (têtes de flèche), soit de petites inclusions de forme sphérique (flèches) (**Figure 39**). Ainsi l'injection de fibrilles d'hα-syn est capable d'induire la pathologie α-syn pS129 dans le Str de souris WT.



2. Mise au point des coordonnées d'injection dans le cortex insulaire antérieur

Dans un premier temps nous avons choisi les coordonnées d'injection pour le CI ant à partir de l'atlas stéréotaxique, et nous avons choisi d'injecter les fibrilles aux coordonnées suivantes par rapport au bregma : antéropostérieur (AP) = + 1,34 mm ; médiolatéral (ML) = \pm 3,2 mm ; dorsoventral (DV) = - 3,2 mm. Sur la **Figure 40A**, on peut observer le dernier essai d'injection de monomères d' α -syn fluorescents (marqués à l'ATTO 488) aux coordonnées suivantes : AP = 1,34 mm, ML = \pm 3,2 mm, DV = - 4 mm. Après cet essai, nous avons décidé d'injecter les fibrilles un peu plus latéralement à ML = \pm 3,4 mm afin d'éviter d'injecter trop près du corps calleux, car cela pourrait entraîner un biais dans la propagation de la pathologie. Les coordonnées finales choisies sont donc **AP = + 1,34 mm, ML = \pm 3,4 mm, DV = - 4 mm**. L'étape de mise au point est primordiale puisque sur la planche d'atlas, on constate que ces coordonnées ciblent un point à l'extérieur du cerveau de la souris (**Figure 40B**).

Sur la **Figure 40A**, on observe que le site est bien localisé dans le CI et qu'il est environ situé à AP = + 1,34 mm. De plus, on constate une diffusion du marquage fluorescent dans l'axe AP, indiquant que les monomères diffusent dans cet axe lors de l'injection. On observe également une remontée le long de la trace d'injection indiquant que des monomères se trouvent dans les couches corticales situées au-dessus du CI.

Figure 39. L'injection de fibrilles d' α -syn humaine non mutée dans le striatum dorsal induit une pathologie de l' α -syn dès 55 jours p.i. (A) L'immunohistochimie DAB dirigée contre l' α -syn pS129 avec un contre-marquage à l'hématoxyline de Gill révèle la présence de marquages de type neurite (têtes de flèches) ou de petites inclusions denses (flèches noires) à proximité du site d'injection (*) (A2) et également dans le corps calleux dans l'axe de remontée de l'aiguille (A1), 55 jours p.i. Les flèches épaisses jaunes indiquent la présence du solvant dans lequel sont diluées les fibrilles. (B) Le marquage immunofluorescent dirigé contre l' α -syn pS129 permet d'observer les marquages de type neurite (têtes de flèche) à proximité du site d'injection (*) 55 jours p.i. On remarque que le solvant déjà observé en (A) apparaît également fluorescent (flèches jaunes). (C) A 4 mois p.i. l'immunohistochimie révèle un marquage important dirigé contre l' α -syn pS129 à proximité du site d'injection (*). On observe les mêmes types d'inclusions qu'à 55 jours p.i. : de type neurite (têtes de flèches) et les petites inclusions sphériques denses (flèches noires).

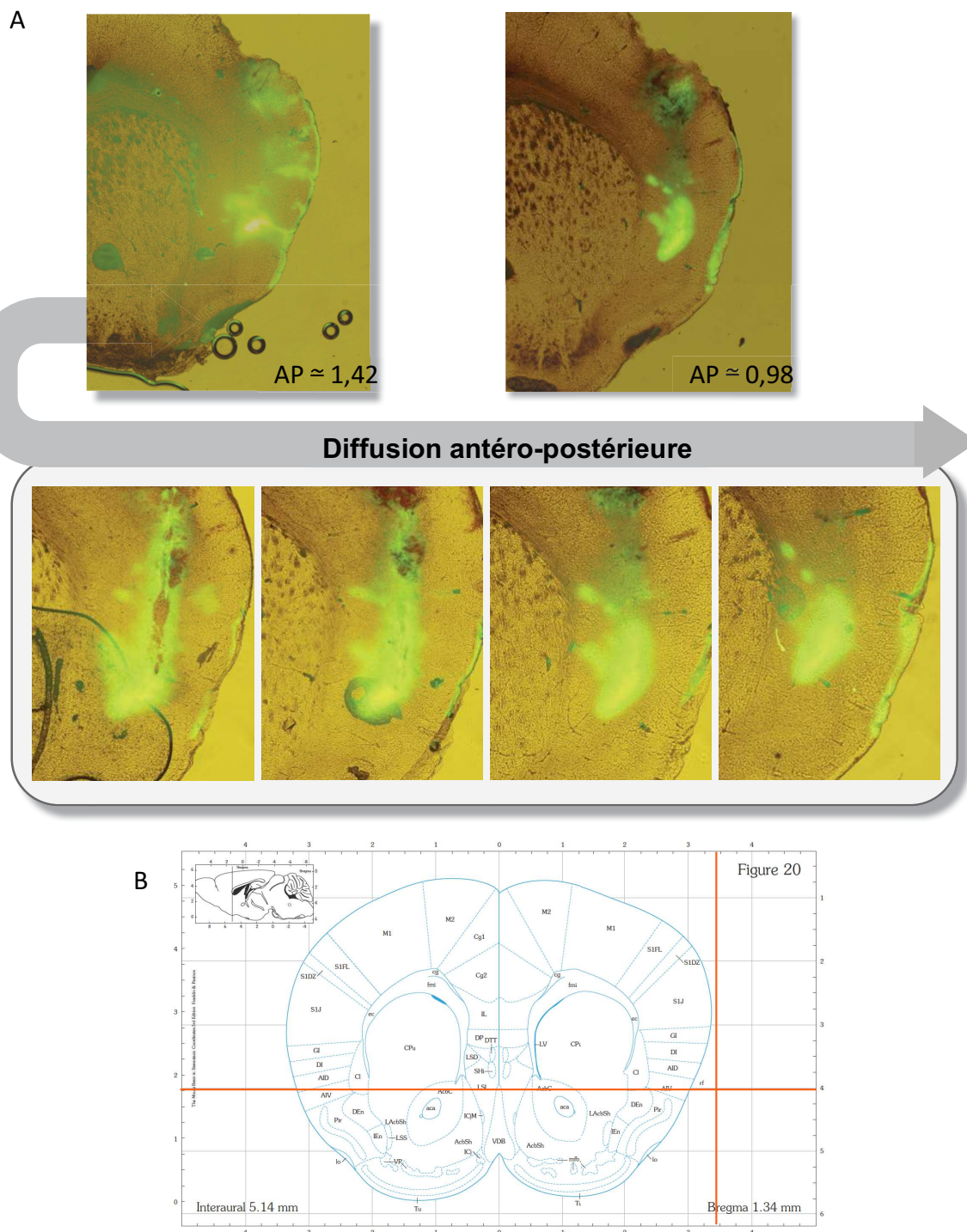


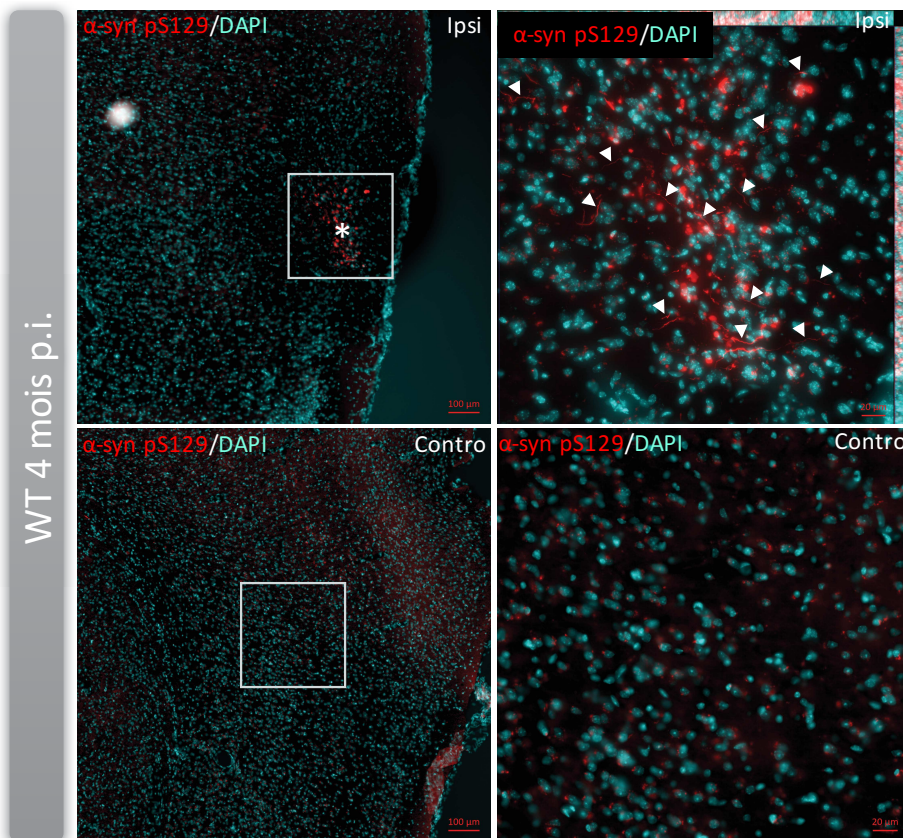
Figure 40. Coupes frontales d'un cerveau de souris injecté avec des monomères ATTO488. (A) On observe que le site d'injection se situe bien dans le cortex insulaire environ à AP = + 1,34 mm, et que les monomères diffusent dans l'axe antéropostérieur. **(B)** Planche tirée de l'atlas « The Mouse Brain in stereotaxic coordinates » (Franklin et Paxinos, 2007). La croix orange indique les coordonnées stéréotaxiques finales choisies pour les chirurgies : par rapport au bregma : AP = + 1,34 mm ; ML = + 3,4 mm ; DV = - 4 mm.

Nous savons déjà que les fibrilles peuvent induire une pathologie α -syn dans le Str dorsal des souris WT dès 55 jours p.i., et toujours observée 4 mois p.i. Nous avons alors réalisé des injections unilatérales de fibrilles d' α -syn non mutée dans le CI ant de souris WT et SNCA et nous avons prélevé les cerveaux 4 mois p.i. L'immunomarquage fluorescent dirigé contre l' α -syn pS129 a mis en évidence l'induction de pathologie α -syn pS129 à proximité du site d'injection comme cela était observé dans le Str, à la fois dans le CI ant des souris WT (**Figure 41A, Ipsi**) et des SNCA (**Figure 41B, Ipsi**). On constate qu'il y a eu une remontée dans la trace d'injection, comme cela était observé avec les injections de monomères fluorescents lors de la mise au point (**Figure 40**), induisant une pathologie α -syn dans les structures somatosensorielles qui sont dorsales au CI ant (**Figure 41B, Ipsi**). On peut également observer des marquages contralatéraux de type neurite dans le cortex somatosensoriel d'une souris SNCA injectée fibrille, au-dessus du cortex insulaire (**Figure 41B, Contro**).

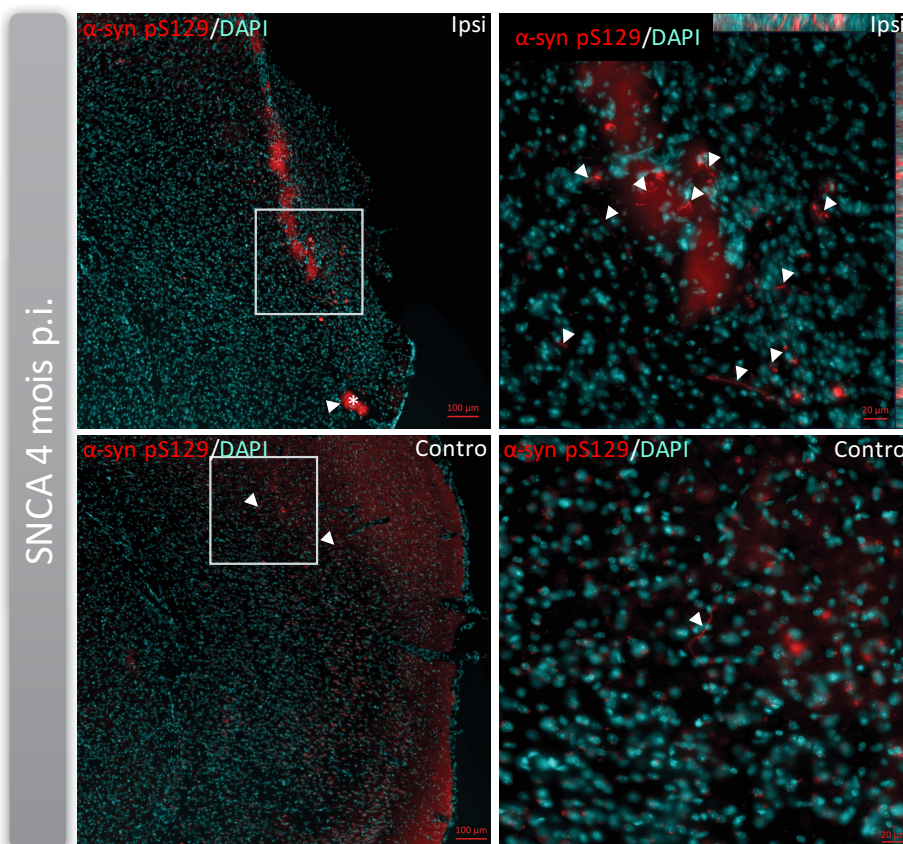
L'immunohistochimie DAB dirigée contre l' α -syn pS129, réalisée sur des coupes de cerveaux de souris WT 4 mois p.i. de fibrilles dans le CI ant, marque des structures de type neurite (têtes de flèches) comme celles observées en fluorescence, ainsi que de petites inclusions sphériques (flèches) (**Figure 41C**), à proximité du site d'injection.

Les structures sphériques apparaissant marquées en immunohistochimie sont difficilement identifiables en fluorescence. En effet, en immunohistochimie on peut observer des marquages sphériques jaunâtres dans la trace d'injection et au niveau du site d'injection (**Figure 39A**) qui serait des « résidus » du solvant des fibrilles. En fluorescence on observe également des marquages sphériques légèrement transparents, et marqués par l'Ac secondaire dirigé contre l'Ac anti α -syn pS129. Du fait de leur faible opacité, j'en ai déduit que ces marquages pouvaient être liés au solvant, ainsi il est difficile de distinguer le marquage sphérique propre à l' α -syn pS129, et observée en immunohistochimie, alors que les marquages de type neurite sont facilement distinguables en fluorescence.

A



B



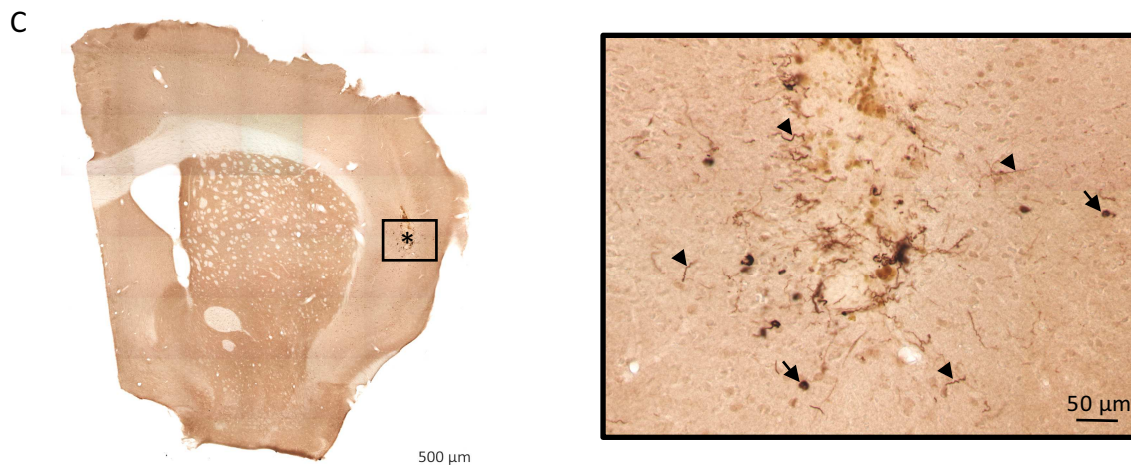


Figure 41. L'injection de fibrilles d' α -syn humaine non mutée dans le CI ant induit une pathologie α -syn à proximité du site d'injection chez les souris WT et SNCA 4 mois p.i. (A, B) Marquage fluorescent α -syn pS129 dans le CI ant ipsilatéral (Ipsi) ou controlatéral (Contro) de souris WT (A) et SNCA (B). On observe des marquages de type neurite de Lewy (têtes de flèches) à proximité du site d'injection (*) (A et B, Ipsi), et également en controlatéral chez la souris SNCA (B, Contro). (C) Immunohistochimie dirigée contre l' α -syn pS129 sur une coupe frontale de cerveau de souris WT 4 mois p.i. On observe de nombreuses inclusions de types neurite de Lewy (têtes de flèches) autour du site d'injection (*), ainsi que des inclusions sphériques (flèches).

B. Développement et caractérisation du modèle SNCA fibrilles

Une fois la mise au point terminée, nous avons alors réalisé les injections bilatérales dans le CI ant de souris WT et SNCA âgées de 5 mois permettant de générer trois groupes expérimentaux : WT PBS et SNCA PBS qui constituent les groupes contrôles, et SNCA fibrilles (FIB) qui constitue le groupe test. 7 mois plus tard, c'est à dire lorsque les souris étaient âgées de 12 mois, j'ai commencé la caractérisation comportementale. J'ai reproduit les tests réalisés sur les souris SNCA âgées de 12 à 14 mois, afin de déterminer si l'injection des fibrilles dans le CI ant aggravait le phénotype cognitif de notre modèle SNCA. D'autres tâches comportementales ont été ajoutées pour cette caractérisation par rapport à la première étude.

1. Caractérisation comportementale des souris SNCA FIB âgées de 12 à 14 mois (7-9 mois p.i.)

a) Evaluation de l'anxiété grâce au labyrinthe en croix surélevé

Afin d'évaluer le niveau d'anxiété des souris, on peut utiliser le labyrinthe en croix surélevé. C'est le premier test que l'on réalise afin de tester le niveau « basal » de l'anxiété, et non pas après manipulation des animaux par l'expérimentateur. Chaque souris effectue un unique passage de 10 min dans le dispositif constitué de deux bras ouverts (lumineux et exposés) et deux bras fermés (sombres et confinés) (**Figure 42A**). Globalement, l'ensemble des souris effectuent plus d'entrées (**Figure 42B**) et passent plus de temps (**Figure 42C**) dans les bras fermés que dans les bras ouverts (entrées : $F_{(1,60)} = 453,6$, $p < 0,001$; temps : $F_{(1,60)} = 235,3$, $p < 0,001$), ce qui est un comportement classique. De plus, si l'on mesure les durées moyennes des visites dans les bras ouverts et dans les bras fermés, on constate qu'elles ne diffèrent pas significativement, même si il y a une tendance globale à ce que les visites des bras fermés soient plus longues (**Figure 42D**) ($F_{(1,57)} = 3,248$; $p = 0,077$).

Il n'y a pas d'effet du groupe pour l'ensemble de ces paramètres, c'est à dire pas de différence entre les souris WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB (entrées : $F_{(2,60)} = -5,59 \cdot 10^{-14}$, $p > 0,999$; temps : $F_{(2,60)} = 0,451$, $p = 0,639$; durée de visite : $F_{(2,57)} = 0,263$, $p = 0,770$). Ainsi cette tâche comportementale indique qu'il n'y a pas de différence du niveau d'anxiété entre ces trois groupes expérimentaux.

b) Evaluation de la mémoire spatiale de référence dépendante de l'HD

La mémoire spatiale de référence a été testée grâce à la piscine de Morris. L'apprentissage spatial a été réalisé sur 5 jours à raison de 4 essais par jour. Au préalable, chaque souris réalise un essai de nage forcée. Lors de cette tâche on constate que la vitesse de nage des souris WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB ne diffère pas (**Figure 43A**) ($p = 0,106$). De plus, on vérifie qu'il n'y a pas de préférence envers un quadrant, et plus particulièrement envers le quadrant où se trouvera la plateforme lors de l'acquisition, c'est à dire le quadrant SE. Au contraire, on observe même que les souris passent significativement moins de temps

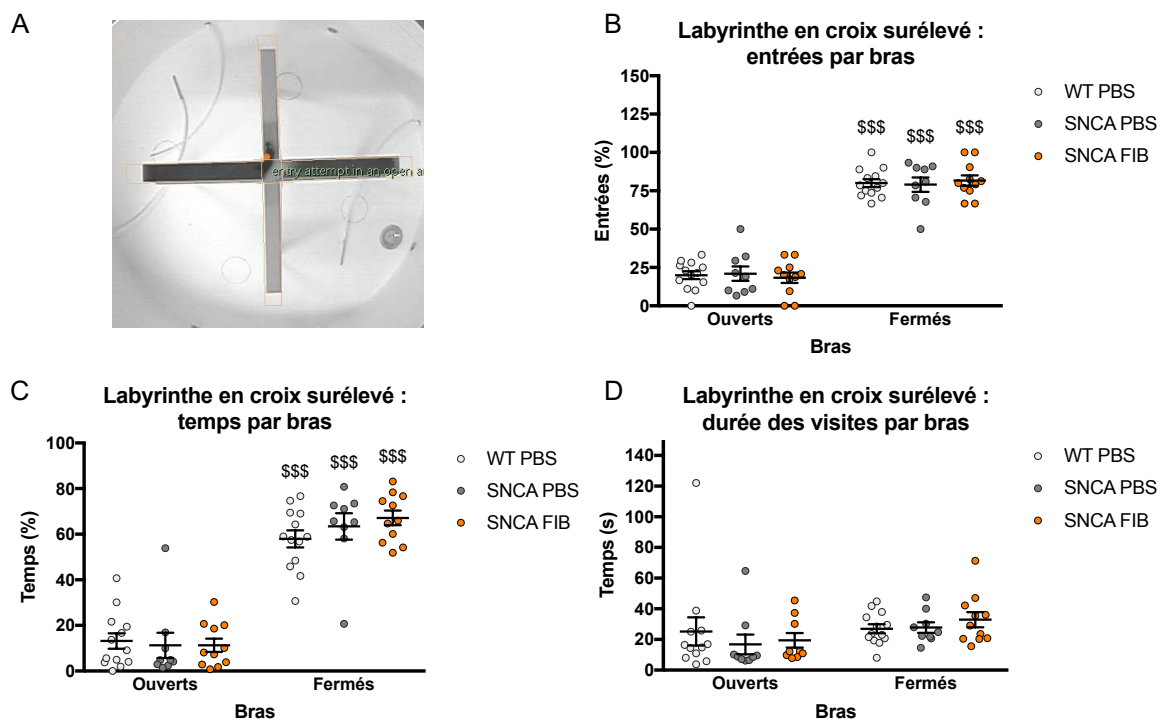
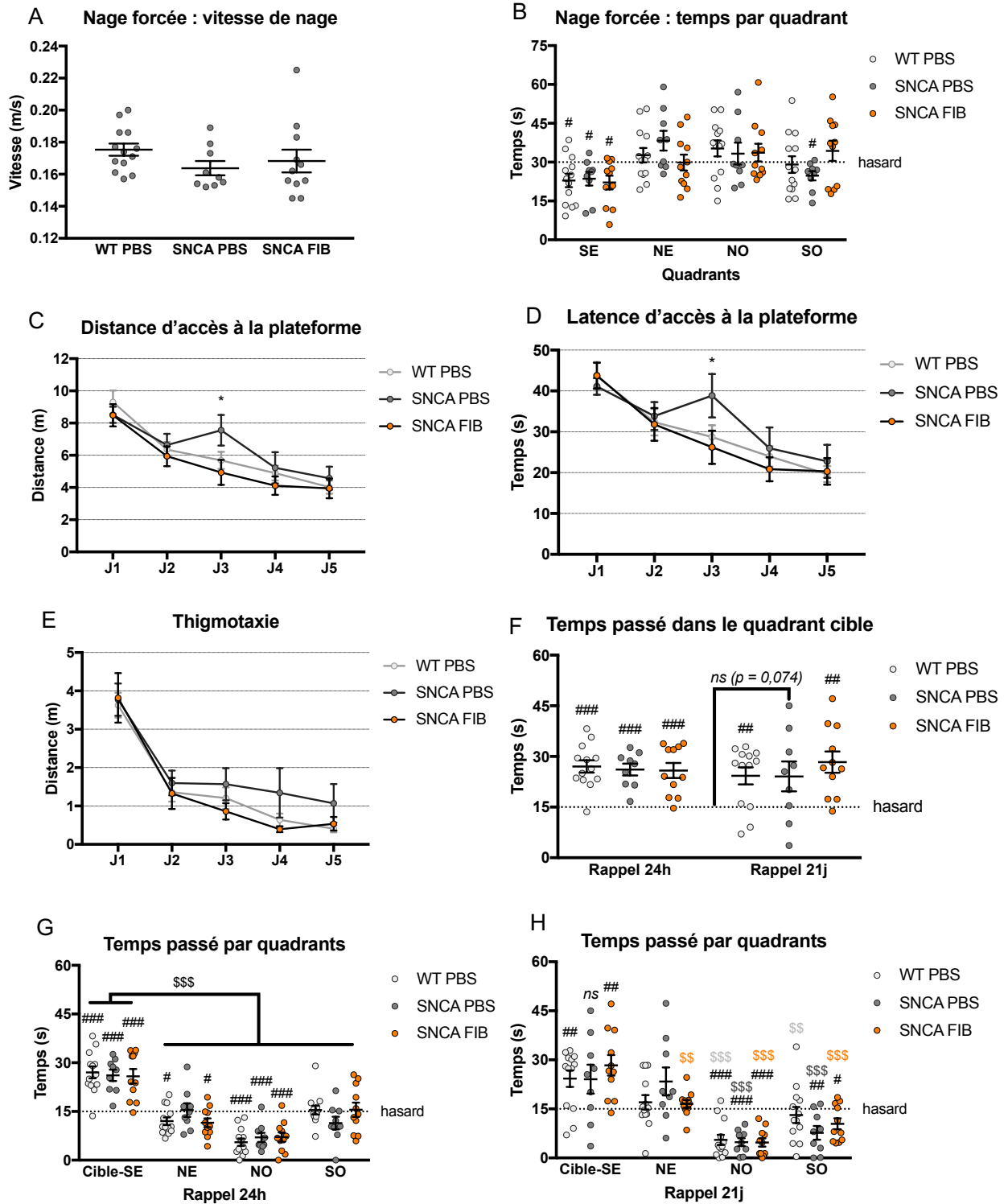


Figure 42. Les souris SNCA FIB ne présentent pas de différence du niveau d'anxiété basale comparé aux souris WT PBS et SNCA PBS, dans le test du labyrinthe en croix surélevé. **(A)** Vue du dessus du labyrinthe en croix surélevé, visualisé sur le logiciel Any-Maze. **(B)** Nombre moyen d'entrées dans les bras ouverts et fermés, exprimé en pourcentage du nombre total d'entrées dans les bras ouverts et fermés. Les souris WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB font significativement plus d'entrées dans les bras fermés comparé aux bras ouverts. **(C)** Temps moyen passé dans les bras ouverts et fermés, exprimé en pourcentage du temps total du test (600s). Les trois groupes expérimentaux passent significativement plus de temps dans les bras fermés comparé aux bras ouverts. **(D)** Durée moyenne des entrées dans les bras ouverts et fermés. Les souris WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB effectuent des entrées de durées similaires dans les bras ouverts, ainsi que dans les bras fermés. De plus il n'y a pas de différence de durée d'entrées entre les bras fermés et ouverts. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM ($n = 13$ WT PBS + 9 SNCA PBS + 11 SNCA FIB ; $$$$ p < 0,001$ par rapport aux bras ouverts dans chaque groupe expérimental respectif, test de comparaisons multiples de Sidak).

dans ce quadrant comparé au hasard (**Figure 43B**) (WT PBS $p = 0,017$, $p < 0,05$; SNCA PBS $p = 0,041$, $p < 0,05$; SNCA FIB $p = 0,014$, $p < 0,05$).

On observe qu'au cours des 5 jours d'acquisition, la distance moyenne parcourue pour atteindre la plateforme SE diminue (**Figure 43C**) ($F_{(4,120)} = 23,39$, $p < 0,001$), sans différence entre les groupes ($F_{(2,30)} = 2,481$, $p = 0,101$), même si on observe une baisse de performances inexplicée des souris SNCA PBS au jour 3 uniquement. De même, la latence moyenne d'accès à la plateforme diminue au cours des jours d'acquisitions (**Figure 43D**) ($F_{(4,120)} = 20,88$, $p < 0,001$), sans différence liée au groupe ($F_{(2,30)} = 1,074$, $p = 0,354$). La thigmotaxie, qui représente l'action de nager à proximité de la paroi et reflète l'anxiété, diminue également au cours des jours d'acquisition ($F_{(4, 120)} = 46,74$, $p < 0,001$), majoritairement entre les jours 1 et 2 ($p < 0,001$), et sans différence entre les groupes ($F_{(2,30)} = 1,499$, $p = 0,240$). On peut donc en conclure que les souris WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB acquièrent toutes une mémoire spatiale au cours des 5 jours d'apprentissage, sans différence majeure entre les groupes, et présentent un même niveau d'anxiété dans cette tâche.

Lors des tests de rappel à 24h et 21j post-acquisition, on mesure le temps passé dans les quadrants virtuels de la piscine. On peut observer qu'à 24h post acquisition, tous les groupes passent significativement plus de temps que le hasard dans le quadrant cible (**Figures 43F et 43G**) ($p < 0,001$), alors qu'à 21j seules les souris WT PBS et SNCA FIB y passent significativement plus de temps (**Figure 43F et 43H**) (WT PBS $p = 0,004$, $p < 0,01$; SNCA PBS $p = 0,074$; SNCA FIB $p = 0,002$, $p < 0,01$). On n'observe cependant pas de différence entre les groupes au sein de chaque phase de rappel (24h ($F_{(2,30)} = 0,113$, $p = 0,894$; 21j $k = 0,590$, $p = 0,745$). De plus, les performances des souris ne sont pas modifiées par le délai du rappel ($F_{(1,30)} = 0,183$, $p = 0,672$) (**Figure 43F**). Si l'on compare le temps passé dans l'ensemble des quadrants lors des phases de rappel, on constate que les souris passent significativement plus de temps dans le quadrant cible que dans les autres quadrants à 24h (**Figure 43G**) ($p < 0,001$), ce qui n'est pas le cas pour tous les groupes à 21j. En effet à 21j post-acquisition, seules les souris SNCA FIB passent significativement plus de temps dans le quadrant cible SE que dans tous les autres quadrants (**Figure 43H**) (SE vs NE $p = 0,005$, $p < 0,01$; SE vs NO $p < 0,001$; SE vs SO $p < 0,001$). Les souris WT PBS et SNCA PBS passent significativement plus de temps dans le quadrant cible comparé aux quadrants NO et SO (WT PBS : SE vs NO $p < 0,001$, SE vs SO $p = 0,004$, $p < 0,01$; SNCA PBS : SE vs NO $p < 0,001$, SE vs SO $p < 0,001$) mais pas comparé au quadrant adjacent NE (WT PBS $p = 0,112$; SNCA PBS $p = 0,998$). Il est cependant important de



noter que les souris WT PBS et SNCA PBS ne passent pas significativement plus de temps que le hasard (15 s) dans le quadrant NE (**Figure 43H**) ($m_{(WT\ PBS)} = 17\text{ s}$, $p = 0,373$; $m_{(SNCA\ PBS)} = 23,4\text{ s}$, $p = 0,085$).

On peut donc conclure que la mémoire spatiale à long terme récente est préservée pour tous les groupes. Cependant la mémoire à long terme ancienne n'est préservée que chez les souris WT PBS et SNCA FIB, et est déficiente chez les souris SNCA PBS.

Figure 43. L'apprentissage et la mémoire spatiale de référence en piscine de Morris sont préservés chez les souris SNCA FIB âgées de 12-14 mois. (A) Vitesse de nage lors de la nage forcée (Test de Kruskal-Wallis : effet groupe $k = 4,496$, $p = 0,106$). **(B)** Temps moyen passé par quadrant lors de la nage forcée et comparaison au hasard (30s) (ANOVA à deux facteurs : effet quadrants $F_{(3,120)} = 7,94$, $p < 0,001$; Test t de comparaison d'une moyenne à un standard (30), quadrant SE : WT PBS $p = 0,017$, $p < 0,05$; SNCA PBS $p = 0,041$, $p < 0,05$; SNCA FIB $p = 0,014$, $p < 0,05$; quadrant NE : SNCA PBS $p = 0,062$; quadrant SO : SNCA PBS $p = 0,012$, $p < 0,05$). **(C)** Distance moyenne parcourue par les souris WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB pour accéder à la plateforme au cours de l'acquisition (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet jours $F_{(4,120)} = 23,39$, $p < 0,001$, pas d'effet groupe $F_{(2,30)} = 2,481$, $p = 0,101$; Test de comparaisons multiples de Tukey : J3 SNCA PBS vs SNCA FIB $p = 0,019$, $p < 0,05$). **(D)** Latence moyenne d'accès à la plateforme au cours de l'acquisition (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effets jours $F_{(4,120)} = 20,88$, $p < 0,001$, pas d'effet groupe $F_{(2,30)} = 1,074$, $p = 0,354$; Test de comparaisons multiples de Tukey : J3 SNCA PBS vs SNCA FIB $p = 0,038$, $p < 0,05$). **(E)** Distance parcourue en zone de thigmotaxie lors des 5 jours d'apprentissage (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet jours $F_{(4,120)} = 46,74$, $p < 0,001$, pas d'effet groupe $F_{(2,30)} = 1,499$, $p = 0,240$). **(F)** Temps passé dans le quadrant cible lors des tests de rappels 24h et 21j (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : pas d'effet délai de rappel $F_{(1,30)} = 0,183$, $p = 0,672$, pas d'effet groupe $F_{(2,30)} = 0,815$; Test t de comparaison d'une moyenne à un standard (15) : 24h $p < 0,001$, 21j SNCA PBS $p = 0,074$, SNCA FIB $p = 0,002$, $p < 0,01$; Test des rangs signés de Wilcoxon de comparaison d'une médiane à un standard (15) : WT PBS $p = 0,004$, $p < 0,01$). **(G,H)** Temps moyen passé par quadrant lors des rappels **(E)** 24h (ANOVA à deux facteurs : effet quadrants $F_{(3,120)} = 72,2$, $p < 0,001$; Test de comparaisons multiples de Tukey : SE vs NE, NO, ou SO $p < 0,001$ pour WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB) et **(F)** 21j (ANOVA à deux facteurs : effet quadrants $F_{(3,120)} = 40,4$, $p < 0,001$; Test de comparaisons multiples de Tukey : **WT PBS**, SE vs NE $p = 0,112$, SE vs NO $p < 0,001$, SE vs SO $p = 0,004$, $p < 0,01$; **SNCA PBS**, SE vs NE $p = 0,998$, SE vs NO $p < 0,001$, SE vs SO $p < 0,001$; **SNCA FIB**, SE vs NE $p = 0,005$, $p < 0,01$; SE vs NO $p < 0,001$; SE vs SO $p < 0,001$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 13$ WT PBS + 9 SNCA PBS + 11 SNCA FIB ; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparé au hasard ; * $p < 0,05$ SNCA PBS vs SNCA FIB ; \$\$\$ $p < 0,001$ comparé au temps passé par chaque groupe respectivement dans le quadrant Cible-SE ; \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ comparé au temps passé par les WT PBS dans le quadrant Cible-SE ; \$\$\$ $p < 0,001$ comparé au temps passé par les SNCA PBS dans le quadrant Cible-SE ; \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ comparé au temps passé par les SNCA FIB dans le quadrant Cible-SE. SE, Sud-Est ; NE, Nord-Est ; NO, Nord-Ouest ; SO, Sud-Ouest.

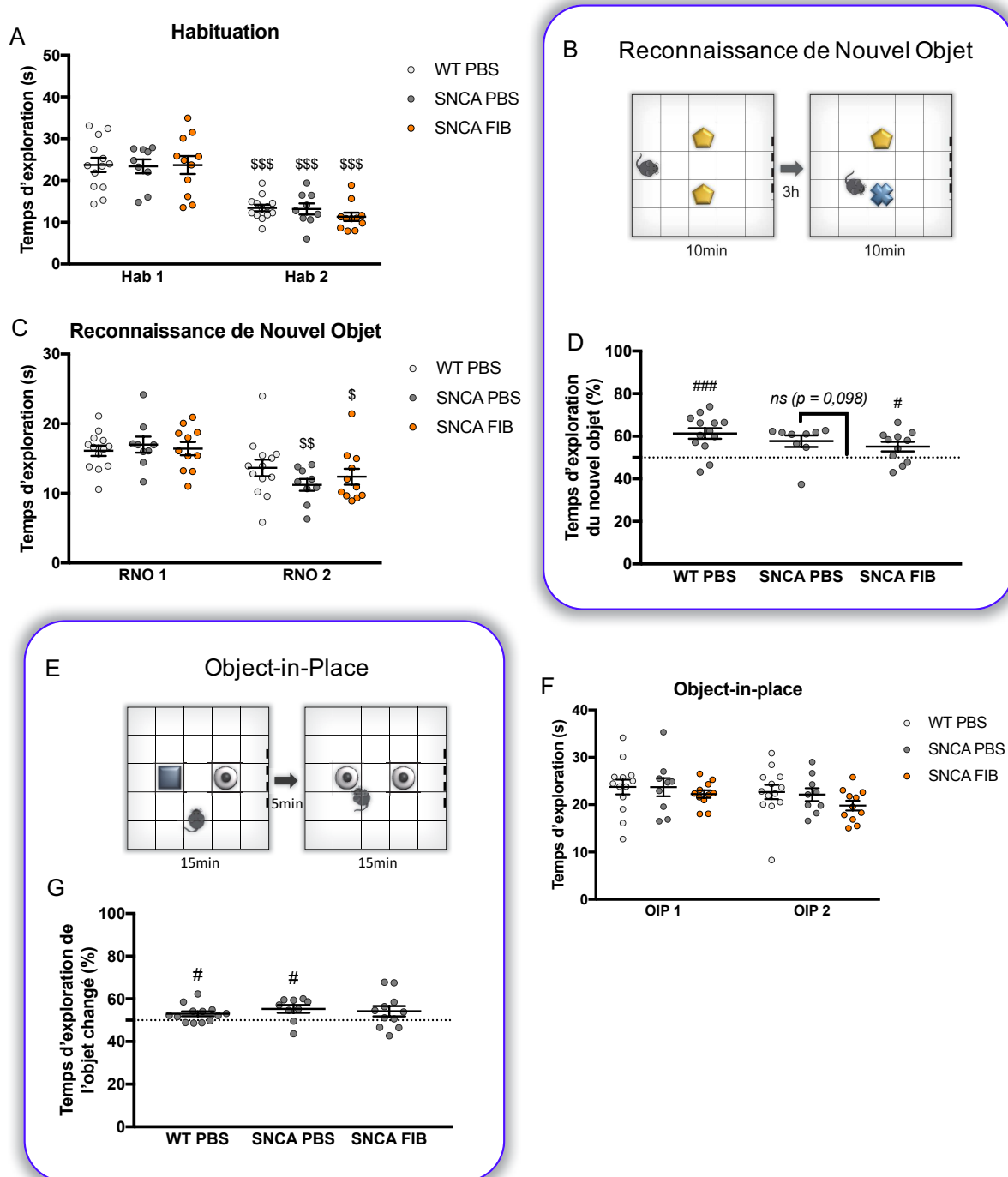
c) Evaluation de deux types de mémoire de reconnaissance : RNO et OiP

Les mêmes tests de reconnaissance d'objet ont été effectués sur les souris WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB que sur la cohorte SNCA de la première partie, cependant un biais d'exploration observé lors des phases d'acquisition des tâches de localisation d'objet (LO) et de mémoire de l'ordre temporel (mOT) ne permet pas d'exploiter leurs résultats. En effet, les souris explorent significativement plus que le hasard l'objet déplacé lors de la phase d'acquisition de la tâche de LO, et pour la tâche de mOT on observe le même problème que pour la caractérisation des souris SNCA (voir « Mémoire de l'ordre temporel », p. 121-123). Ainsi uniquement les résultats de la reconnaissance de nouvel objet (RNO) et de l'objet-in-place (OiP) sont présentés.

Le jour précédant le début des tests, chaque souris est habituée à l'enceinte dans laquelle se trouvent deux objets. Les souris explorent ces objets lors de deux phases (Hab 1 et Hab 2 séparées de 3 h). Le temps d'exploration ne diffère pas entre les groupes WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB lors de chaque phase (**Figure 44A**) ($F_{(2,30)} = 0,244$, $p = 0,785$), mais le temps d'exploration diminue lors de la deuxième exposition (Hab 2) ($F_{(1,30)} = 96,9$, $p < 0,001$), ce qui est normal puisque les objets sont familiers et suscitent donc moins d'intérêt de la part des souris.

Lors du test de RNO, les souris sont exposées à deux objets identiques pendant 10 min, puis après 3 h elles sont à nouveau placées dans l'enceinte mais un objet a été remplacé par un nouveau (**Figure 44B**). Lors de cette tâche, le temps total d'exploration des objets ne diffère pas entre les trois groupes ($F_{(2,30)} = 0,293$, $p = 0,748$), mais les souris SNCA PBS et SNCA FIB explorent moins lors de la phase de rappel (RNO 2) que lors de l'acquisition (RNO 1) (**Figure 44C**) (respectivement $p < 0,003$ et $p < 0,025$). Lors du rappel, on observe que les WT PBS et SNCA FIB explorent significativement plus l'objet nouveau comparé au hasard, mais pas les souris SNCA PBS (**Figure 44D**) (WT PBS $p < 0,001$; SNCA PBS $p = 0,098$; SNCA FIB $p = 0,044$, $p < 0,05$). On n'observe cependant aucune différence entre les performances des trois groupes lors du rappel ($k = 4,331$, $p = 0,115$). Ainsi la mémoire de RNO est altérée chez les souris SNCA PBS à un délai de 3 h, mais est préservée chez les souris WT PBS et SNCA FIB.

Lors du test d'OiP, les souris doivent associer la nature de l'objet à sa localisation afin d'identifier quel est l'objet parmi les deux familiers qui est à la position à laquelle se trouvait l'objet différent lors de l'acquisition (**Figure 44E**). Cet objet est appelé « objet changé ». Le



temps total d'exploration ne diffère pas entre les trois groupes expérimentaux lors des deux phases (**Figure 44F**) ($F_{(2,30)} = 1,03$, $p = 0,371$). Lors du test, les souris WT PBS et SNCA PBS explorent significativement plus l'objet changé comparé au hasard, mais pas les souris SNCA FIB (**Figure 44G**) (WT PBS $p = 0,018$, $p < 0,05$; SNCA PBS $p = 0,039$, $p < 0,05$; SNCA FIB $p = 0,117$). Cependant on n'observe pas de différence de performances entre les trois groupes ($k = 2,324$; $p = 0,313$). On peut conclure de ces résultats que les souris SNCA FIB sont déficitaires dans la tâche d'OiP car elles n'explorent pas l'objet changé différemment du hasard.

Figure 44. La mémoire de RNO, mais pas celle d'OiP, est préservée chez les souris SNCA FIB âgées de 12-14 mois. (A) Temps d'exploration totale des objets lors de l'habituation (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet phase (Hab 1 vs Hab 2) $F_{(1,30)} = 96,9$, $p < 0,001$, pas d'effet groupe $F_{(2,30)} = 0,244$, $p = 0,785$; Test de comparaisons multiples de Sidak Hab 1 vs Hab 2, $p < 0,001$ pour WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB). **(B)** Représentation et protocole de la tâche de RNO. **(C)** Temps d'exploration totale des objets lors des phases d'acquisition et de test de la RNO (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet phase ($F_{(1,30)} = 24,1$, $p < 0,001$, pas d'effet groupe $F_{(2,30)} = 0,293$, $p = 0,748$; Test de comparaisons multiples de Sidak : RNO 1 vs RNO 2, **WT PBS** $p = 0,195$, **SNCA PBS** $p = 0,003$, $p < 0,01$, **SNCA FIB** $p = 0,025$, $p < 0,05$). **(D)** Temps d'exploration du nouvel objet en pourcentage du temps d'exploration totale (Kruskal-Wallis : $k = 4,331$, $p = 0,115$; Test t de comparaison de moyenne à un standard : WT PBS $p < 0,001$, SNCA FIB $p = 0,044$, $p < 0,05$; Test des rangs signés de Wilcoxon de comparaison d'une médiane à un standard : SNCA PBS $p = 0,098$). **(E)** Représentation et protocole de la tâche d'OiP. **(F)** Temps d'exploration totale des objets lors des phases d'acquisition et de test de l'OiP. (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : pas d'effet phase ($F_{(1,30)} = 3,57$, $p < 0,069$), pas d'effet groupe $F_{(2,30)} = 1,03$, $p = 0,371$). **(G)** Temps d'exploration de l'objet changé en pourcentage du temps d'exploration totale. (Kruskal-Wallis : $k = 2,324$, $p = 0,313$; Test t de comparaison de moyenne à un standard : WT PBS $p = 0,018$, $p < 0,05$, SNCA FIB $p = 0,117$; Test des rangs signés de Wilcoxon de comparaison d'une médiane à un standard : SNCA PBS $p = 0,039$, $p < 0,05$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 13$ WT PBS + 9 SNCA PBS + 11 SNCA FIB ; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ comparé au hasard ; \$\$\$ $p < 0,001$ comparaison à la phase d'acquisition de chaque groupe respectif).

d) Test du nouveau goût

Il est décrit dans la littérature que le CI est impliqué dans l'apprentissage d'un nouveau goût (Swank et Sweatt, 2001 ; Moraga-Amaro et al., 2014 ; Yiannakas et Rosenblum, 2017). Nous avons donc réalisé ce test afin de voir si l'injection de fibrilles dans le CI ant pouvait altérer cette fonction. Chaque groupe expérimental est divisé en deux afin de former un sous-groupe pré-exposé au nouveau goût, et un sous-groupe naïf le jour du test. On observe que les sous-groupe pré-exposés consomment plus de nourriture que les sous-groupes naïfs le jour du test (**Figure 45**) (WT PBS $p < 0,001$, SNCA PBS $p < 0,001$, SNCA FIB $p = 0,003$). La consommation de nourriture ne diffère pas entre les souris WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB ($F_{(2,27)} = 0,113$, $p = 0,893$). De ce fait, on peut conclure que l'injection de fibrilles dans le CI ant n'a pas induit de déficit dans la fonction d'apprentissage d'un nouveau goût.

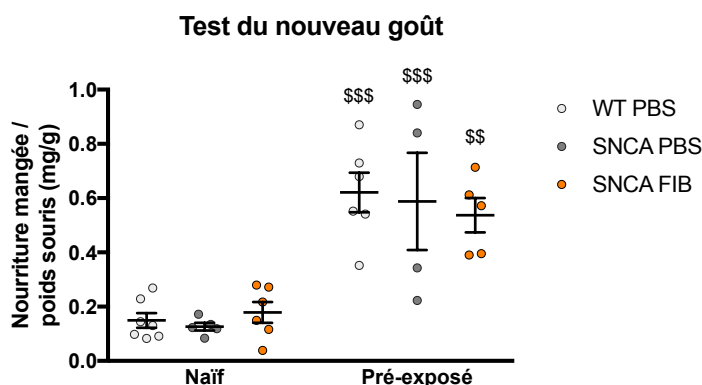


Figure 45. Test du nouveau goût chez les souris SNCA FIB âgées de 12-14 mois. Ratio entre la nourriture moyenne mangée par les souris en 10min en mg et le poids des souris en g. (ANOVA à deux facteurs : effet Naïf vs Pré-exposé $F(1,27) = 56,6$, $p < 0,001$, pas d'effet groupe $F(2,27) = 0,113$, $p = 0,893$; Test de comparaisons multiples de Sidak : WT PBS $p < 0,001$, SNCA PBS $p < 0,001$, SNCA FIB $p = 0,003$ $p < 0,01$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 13$ WT PBS (7 naïfs + 6 pré-exposés) + 9 SNCA PBS (5 naïfs + 4 pré-exposés + 11 SNCA FIB (6 naïfs + 5 pré-exposés))). \$\$\$ $p < 0,001$ comparé au groupe naïf du même génotype.

e) Evaluation des troubles gastrointestinaux

Il est décrit dans la littérature que les patients atteints de MCL souffrent de troubles liés au système nerveux autonome, et en particulier de troubles gastro-intestinaux comme par exemple la constipation (Coon et al., 2018 ; Doi et al., 2019). Les patients atteints de MP présentent également ces troubles. La constipation est caractérisée par un retard ou une difficulté d'évacuation des selles conduisant à une réduction de la fréquence des selles, et à des selles plus dures (chez l'Homme : moins de 3 selles par semaine). Nous avons donc réalisé un test simple qui consiste à prélever les selles des souris pendant une heure et de les peser. Les poids moyens des selles mouillées, c'est à dire directement fraîchement collectées, ou des selles sèches, ne diffèrent pas entre les trois groupes expérimentaux (**Figures 46A et B**) (respectivement $k = 1,183$, $p = 0,554$, et $F_{(2,30)} = 0,543$, $p = 0,586$). On peut conclure de ces résultats que les souris SNCA FIB ne présentent pas de trouble du système gastrointestinal, du moins comparé aux souris WT PBS et SNCA PBS.

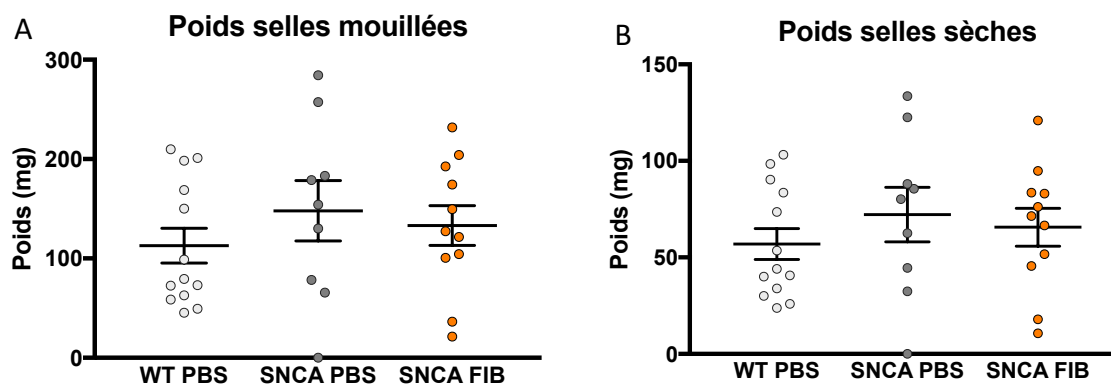


Figure 46. Pesée des selles chez les souris SNCA FIB âgées de 12-14 mois. (A) Poids des selles mouillées (Kruskal-Wallis : pas d'effet groupe $k = 1,183$, $p = 0,554$). **(B)** Poids des selles sèches (ANOVA à un facteur : pas d'effet groupe $F_{(2,30)} = 0,543$, $p = 0,686$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 13$ WT PBS + 9 SNCA PBS + 11 SNCA FIB).

f) Evaluation de la capacité à construire son nid : tâche de « nesting »

Un score de nesting a été attribué aux souris WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB 1 h 40 et 24 h après le début de la tâche (**Figure 47**). Il y a un effet du délai sur le score ($F_{(1,46)} = 15,6$; $p = 0,0003$). Cependant, uniquement les souris SNCA FIB ont un meilleur score au délai 24 h qu'au délai 1h40 ($p = 0,032$). On n'observe aucune différence entre les différents groupes à chacun des deux délais, indiquant que les souris SNCA FIB ne présentent pas d'altération dans la capacité à construire leurs nids en comparaison aux souris WT PBS et SNCA PBS. De plus après 24 h, chaque groupe présente un score minimal de 2, indiquant que toutes les souris rassemblent plus ou moins leurs morceaux de papier après ce délai.

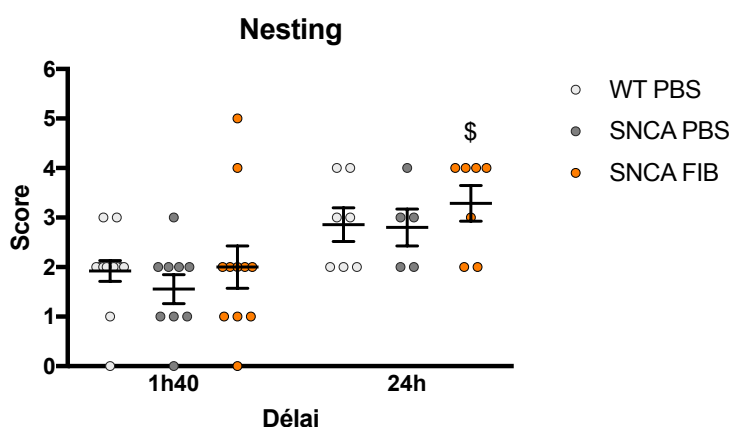


Figure 47. Le nesting n'est pas affecté chez les souris SNCA FIB à 12-14 mois. Score moyen de nesting après 1h40 et 24h. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM ($n = 13/7$ WT PBS + $9/5$ SNCA PBS + $11/7$ SNCA FIB ; \$ $p < 0,05$, test de comparaisons multiples de Sidak).

g) Evaluation de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice des souris au cours des deux jours et deux nuits est présentée en termes de déplacements moyen horizontaux effectués par heure (**Figure 48A**). L'ANOVA à mesures répétées révèle un effet global de l'heure d'enregistrement ($F_{(47,1316)} = 9,881$; $p < 0,001$) sur l'activité locomotrice, mais pas d'effet du groupe ($F_{(2,28)} = 2,263$; $p = 0,123$). On observe cependant que pendant la première nuit, les souris SNCA FIB sont significativement moins actives que les souris WT PBS à 23h et à 1h (respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,05$), ainsi qu'à la fin de la deuxième nuit à 7h ($p < 0,05$). En analysant la moyenne des déplacements des souris par heure, sur les deux nuits et sur les deux jours grâce à un ANOVA à deux facteurs, on observe clairement la différence d'activité locomotrice entre la nuit et le jour (**Figure 48B**) ($F_{(1,56)} = 82,8$; $p < 0,001$), les souris étant toutes moins actives pendant la journée ($p < 0,001$). On observe également un effet du groupe ($F_{(2,56)} = 3,49$; $p = 0,037$), lié à l'activité locomotrice moins importante des SNCA FIB lors de la nuit, comparé aux souris WT PBS ($p = 0,004$). Elles ne sont cependant pas moins actives que les souris SNCA PBS pendant la nuit ($p = 0,127$).

h) Evaluation de la coordination motrice grâce au test de la barre

La coordination motrice a également été testée à l'aide du test de la barre, lors de 5 essais successifs. Le temps moyen de traversée de la barre ne diffère pas entre les trois groupes (**Figure 49A**) ($F_{(2,30)} = 0,625$; $p = 0,542$), ni le nombre moyen d'erreurs, c'est à dire de glissements de pattes le long de la barre ($p = 0,671$). Ainsi les souris SNCA FIB ne présentent pas de déficit moteur majeur 7 mois après l'injection de fibrilles dans le CI ant.

Figure 49. Les souris SNCA FIB ne présentent pas de déficits de coordinations motrices dans le test de la barre à 12-14 mois. (A) Latence moyenne d'accès à la plateforme au cours des 5 essais. (B) Nombre moyen d'erreurs lors de la traversée de la barre. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 13$ WT PBS + 9 SNCA PBS + 11 SNCA FIB).

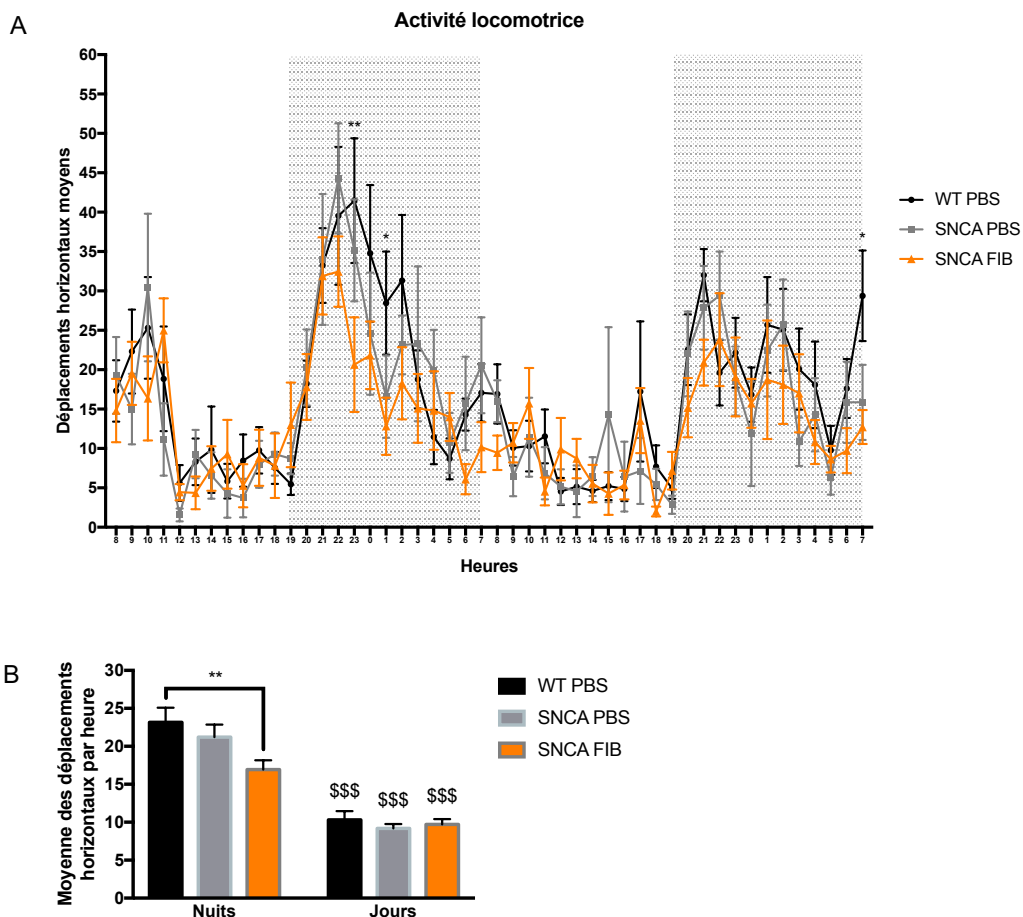
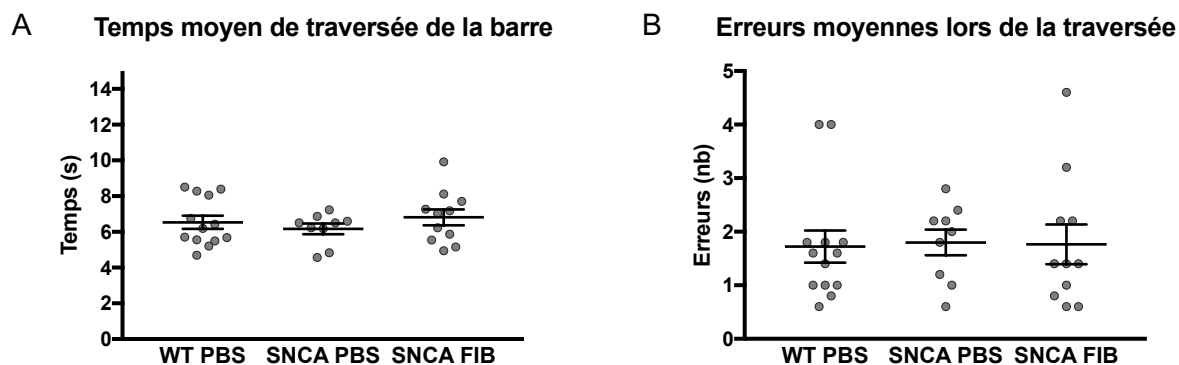


Figure 48. Les souris SNCA FIB ont une activité locomotrice nocturne réduite par rapport aux souris WT PBS à 12-14 mois. (A) Le croisement successif des deux faisceaux infrarouges à chaque extrémité de la cage est compté comme un déplacement horizontal. L'activité locomotrice des souris WT PBS, SNCA PBS et SNCA FIB est représentée par les déplacements horizontaux par heure durant deux jours et deux nuits (zones grisées). **(B)** L'activité moyenne par heure est analysée sur l'ensemble des deux jours et deux nuits. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM ($n = 13$ WT PBS + 7 SNCA PBS + 11 SNCA FIB ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ WT PBS vs SNCA FIB test de comparaisons multiples de Tukey; \$\$\$ $p < 0,001$ par rapport aux nuits dans chaque groupe expérimental respectif, test de comparaisons multiples de Tukey).



2. Cartographie de la pathologie α -syn induite par l'injection bilatérale des fibrilles

Les souris ont été mises à mort suite à la caractérisation comportementale. Les cerveaux ont été récupérés afin de réaliser des marquages immunohistochimiques dirigés contre l' α -syn pS129 et d'évaluer la propagation des fibrilles suite à l'injection dans le CI ant.

La pathologie principalement observée en comparaison aux souris SNCA est la présence de marquages de types neurites observés à proximité du site dans le CI ant, ainsi que dans des régions distantes. Néanmoins cette pathologie n'est pas sévère pour la plupart des souris SNCA FIB, et uniquement deux souris ont présenté une pathologie à la fois sévère et étendue. Ainsi, la cartographie a été réalisée à partir des observations de la pathologie la plus étendue sur des coupes frontales d'une seule souris afin d'obtenir un aperçu du potentiel pathologique de l'injection des fibrilles dans le CI ant (**Figure 50**). Nous avons pu observer ce que nous pensons être une propagation/induction de la pathologie dans l'ensemble du CI (antérieur et postérieur ; granulaire, dysgranulaire et agranulaire), et dans des structures qui y sont connectées (Gogolla, 2017 ; Gehrlach et al., 2020) :

- les régions olfactives antérieures (AOE, AOD, AOL, AOM, AOV)
- le cortex orbitofrontal (DLO, LO et MO)
- le cortex préfrontal médian (CPFm : cortex cingulaire antérieur (Cg), cortex prélimbique (PrL), cortex infralimbique (IL) et cortex orbital médian (MO))
- le cortex somatosensoriel primaire (S1)
- le cortex moteur (M1, M2)
- le **striatum** (Str : CPu, NAc (AcbC, AcbSh), IPAC)
- le **thalamus** (Thal : IMD, MDM, PV, Sub, VM, VPM, ZI)
- l'hypothalamus (Hyp : MCLH, PLH)
- l'aire tegmentale ventrale (VTA)
- l'**amygdale** (Amy : AA, APir, BLA, BMA, BMP)
- la substance noire (SNR, SNC)
- le cortex entorhinal (Lent)
- le noyau cunéiforme (CNF)
- le noyau Raphé (RN : DRVl)
- la substance grise périaqueducale (PAG : VLPAG)

Nous pouvons également observer des marquages pathologiques dans les fibres nerveuses, à savoir le corps calleux qui relie les deux hémisphères et les commissures antérieures (**Figure 50**).

On peut conclure de cette étude que les fibrilles d' α -syn sont capables d'induire une pathologie à partir du CI ant, étendue à des régions connectées, et cela 9 mois p.i. chez des souris qui surexpriment l' α -syn de manière diffuse dans le cerveau, à savoir les souris SNCA.

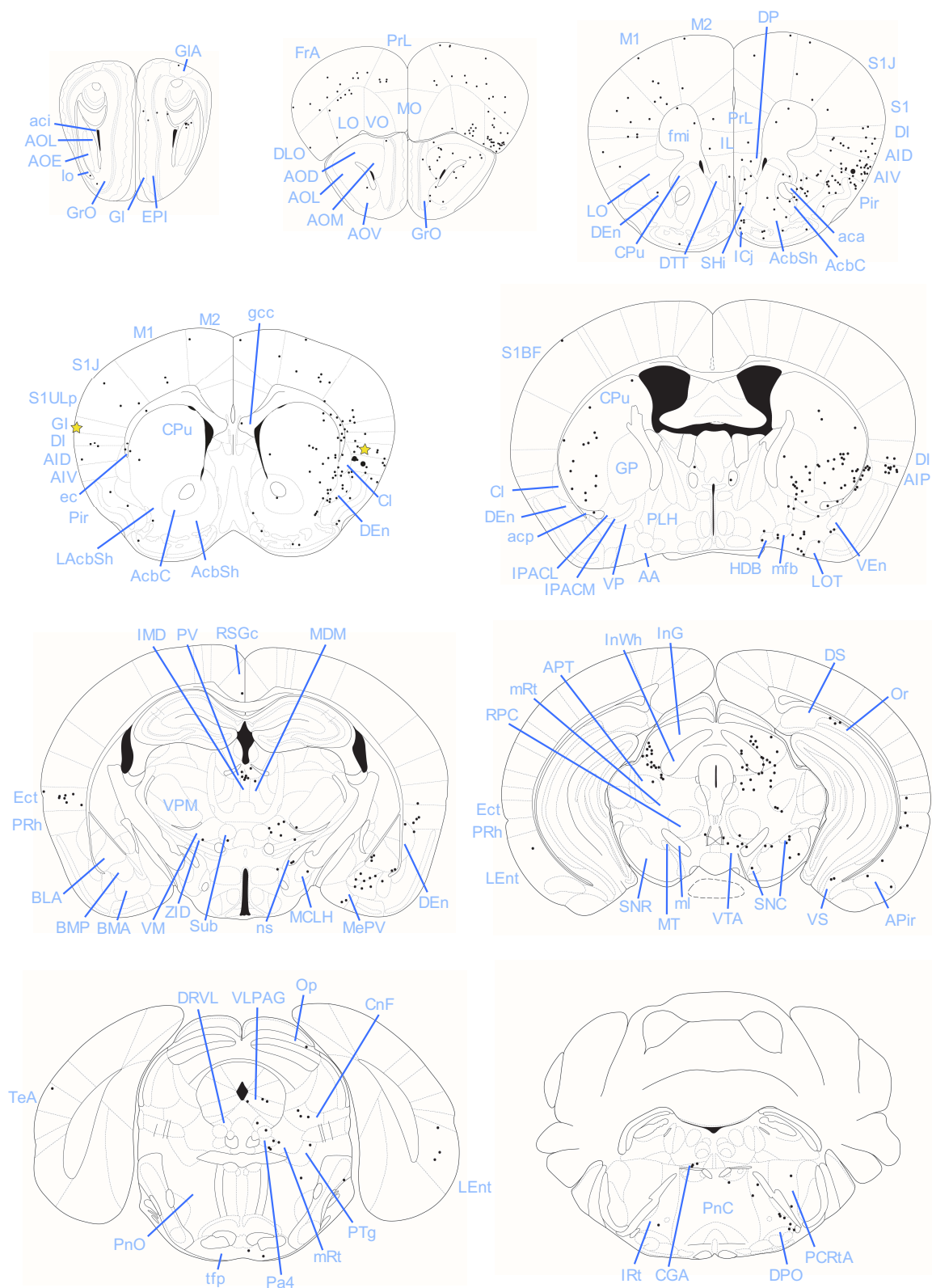


Figure 50. Cartographie de la pathologie α -syn de type neurite 9 mois p.i. bilatérale de fibrilles d' α -syn humaine dans le CI ant. La cartographie représente la distribution de la pathologie de type neurite détectée par un Ac @ α -syn pS129 sur des coupes frontales d'un cerveau de souris SNCA FIB 9 mois p.i. Les deux étoiles représentent la localisation des sites d'injection observés sur les coupes.

AA : région amygdalienne antérieure	IPAC (L/M) : noyau interstitiel du membre postérieur de la commissure antérieure (partie latérale/médiale)
aca : commissure antérieure, partie antérieure	IRT : noyau réticulaire intermédiaire
AcbC : noyau accumbens, coeur	LAcSh : noyau accumbens, coquille, partie latérale
AcSh : noyau accumbens, coquille	LEnt : Cx entorhinal latéral
aci : commissure antérieure, partie intra bulbaire	ll : lemnisque latéral
acp : commissure antérieure, nerf postérieur	LO : cortex orbital latéral
AID : cortex insulaire agranulaire, partie dorsale	lo : tractus olfactif latéral
AIP : cortex insulaire agranulaire, partie postérieure	LOT : noyau du tractus latéral olfactif
AIV : cortex insulaire agranulaire, partie ventrale	M1 : cortex moteur primaire
AOD : région olfactive antérieure, partie dorsale	M2 : cortex moteur secondaire
AOE : région olfactive antérieure, partie externe	MCLH : noyau magnocellulaire de l'hypothalamus latéral
AOL : région olfactive antérieure, partie latérale	MDM : noyau thalamique médiodorsal, partie médiale
AOM : région olfactive antérieure, partie médiale	MePV : noyau amygdalien médial, partie postéroventrale
AOT : noyau prétectal antérieur	mfb : faisceau médial du prosencéphale
AOV : région olfactive antérieure, partie ventrale	ml : lemnisque médian
APir : aire de transition amygdalopiriforme	MO : cortex orbital médial
BLA : noyau amygdalien basolatéral, partie antérieure	mRt : formation réticulaire mésencéphalique
BMA : noyau amygdalien basomédial, partie antérieure	MT : noyau terminal médian
BMP : noyau amygdalien basomédial, partie postérieure	ns : tractus nigrostriatal
CGA : substance grise centrale, partie α	Op : couche du nerf optique du colliculus supérieur
Cl : claustrum	Or : couche oriens de l'hippocampe
CNF : noyau cunéiforme	Pa4 : noyau paratrochléaire
CPu : caudé putamen	PCrTA : noyau réticulaire parvicellulaire, partie α
DEn : claustrum endopiriforme dorsal	Pir : cortex piriforme
DI : cortex insulaire dysgranulaire	PLH : partie pédonculaire de l'hypothalamus latéral
DLO : cortex orbital dorsolatéral	PnC : noyau réticulaire pontique, partie caudale
DP : cortex pédonculaire dorsal	PnO : noyau réticulaire pontique, partie orale
DPO : région péri-olivaire dorsale	PRh : cortex périrhinal
DRVl : noyau dorsal du Raphé, partie ventrolatérale	PrL : cortex prélimbique
DS : subiculum dorsal	PTg : noyau pédonculo-tegmental
DTT : tenia tecta dorsal	PV : noyau thalamique paraventriculaire
ec : capsule externe	RSG : cortex granulaire rétrosplénial
Ect : cortex ectorhinal	S1 : cortex somatosensoriel primaire
EPI : couche plexiforme externe du bulbe olfactif	S1BF : cortex somatosensoriel primaire, champ des barils
Fmi : forceps mineur du corps calleux	S1J : cortex somatosensoriel primaire, région de la mâchoire
FrA : cortex associatif frontal	SHi : noyau septohippocampique
gcc : genou du corps calleux	SNC : substance noire compacte
GI : cortex insulaire granulaire	SNR : substance noire réticulée
GIA : couche glomérulaire du bulbe olfactif accessoire	Sub : noyau thalamique submedius
GrO : couche cellulaire granulaire du bulbe olfactif	TeA : cortex associatif temporal
HDB : noyau du membre horizontal de la bande diagonale	tfp : fibres transverses du pont
ICj : îlots de Calleja	VEnt : claustrum endopiriforme ventral
IL : cortex infralimbique	VLPAG : substance grise périaqueducule
IMD : noyau thalamique intermédiodorsal	VM : noyau thalamique ventromédial
InG : couche de substance grise intermédiaire du colliculus supérieur	VO : cortex orbital ventral
InWh : couche de substance blanche intermédiaire du colliculus supérieur	VP : pallidum ventral
	VPM : noyau thalamique postéromédial ventral
	VS : subiculum ventral
	VTA : aire tegmentale ventrale
	ZID : Zone incertaine, partie dorsale

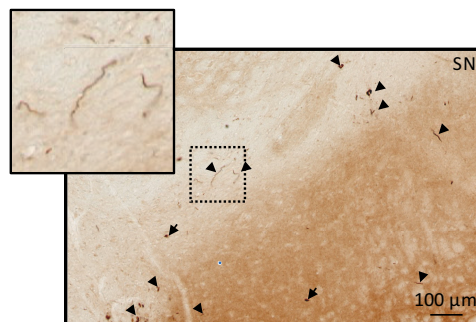
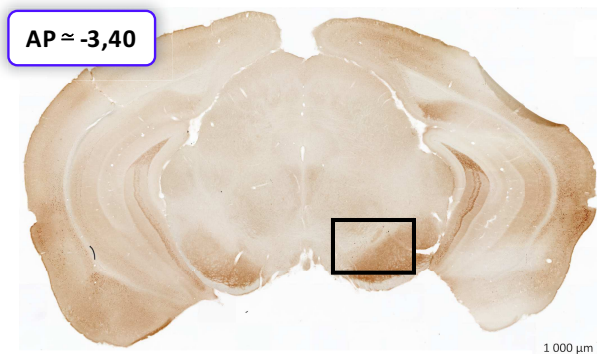
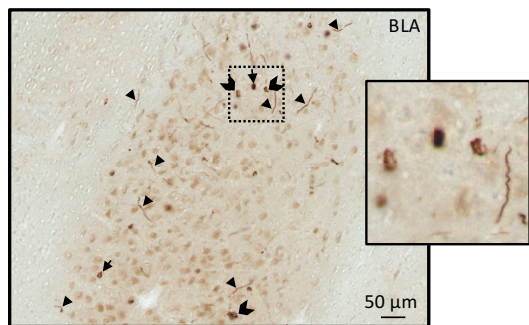
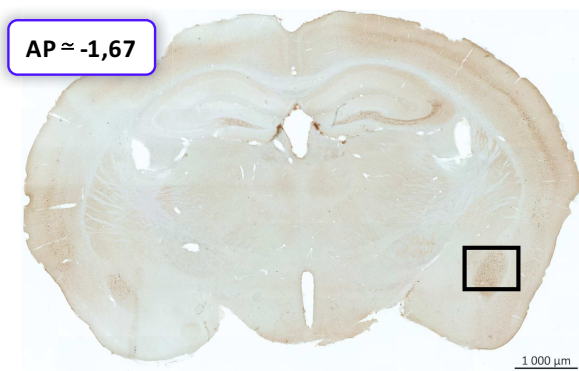
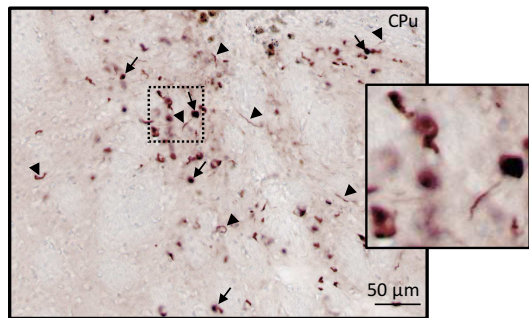
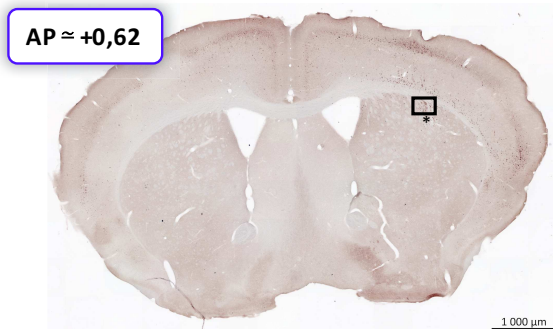
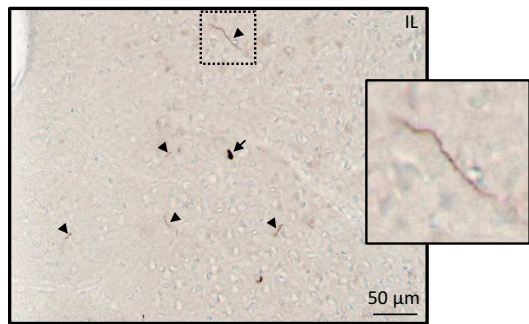
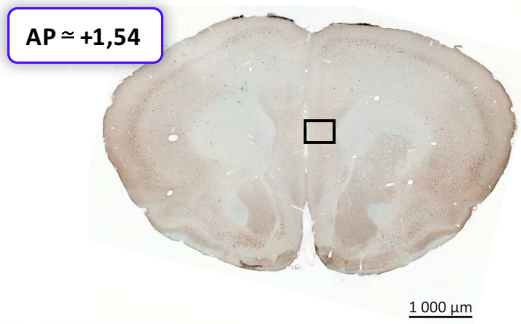
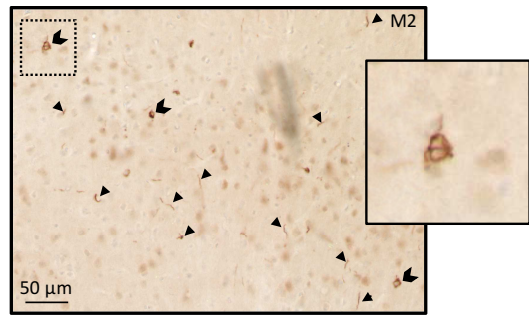
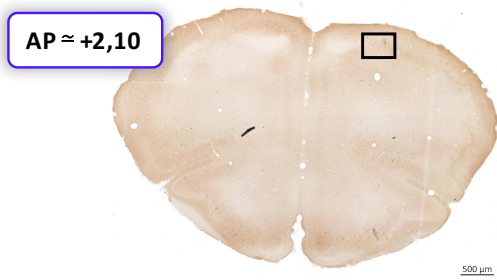
C. Analyse de propagation de la pathologie α -syn après injection unilatérale de fibrilles d' α -syn dans le cerveau de souris WT

1. Propagation de la pathologie α -syn à partir du striatum dorsal

a) Immunohistochimie DAB α -syn pS129 sur coupes frontales

Les injections de fibrilles d' α -syn dans le CPu dorsal de souris WT ont été réalisées dans le cadre de la mise au point. On a vu que les fibrilles induisaient une pathologie α -syn pS129 au niveau du site d'injection (**Figure 51, AP \approx +0,62**), mais on peut également observer la pathologie dans des structures distantes et interconnectées au site d'injection 4 mois p.i. telles que le cortex moteur secondaire (M2), le cortex infralimbique (IL), l'amygdale basolatérale (BLA) ou la substance noire (SN) réticulée et compacte (**Figure 51**). Dans l'ensemble de ces régions on peut observer des marquages de type neurites (têtes de flèches), mais on peut également voir des marquages sphériques et denses (flèches). Dans le M2 et la BLA, d'autres marquages semblent être constitués de neurites agglomérés ou enroulés (chevrons).

Figure 51 Propagation de la pathologie α -syn pS129 à partir du Str dorsal dans des structures anatomiquement connectées dans le cerveau de souris WT. On peut observer différents types de marquages : neurites (têtes de flèches), sphérique dense (flèches), et neurites enroulés/agglomérés (chevrons). Les coordonnées AP sont données par rapport au bregma. *BLA*, amygdale basolatérale ; *CPu*, caudé putamen ; *IL*, cortex infralimbique ; *M2*, cortex moteur secondaire ; *SN*, substance noire.



b) Immunofluorescence α -syn pS129 sur cerveau transparisé

Comme expliqué dans la partie « Transparisation iDISCO » (p. 103-104), la transparisation permet d'imager un volume, ici le cerveau de souris, sans réaliser de coupes ou de sections de ce dernier. Ceci est donc une technique très utile pour observer la propagation de la pathologie α -syn dans l'ensemble du cerveau. Pour cela, nous avons engagé une collaboration avec le Dr. Paolo Giacobini et son doctorant Gaëtan Ternier, du centre de recherche Jean-Pierre Aubert à Lille, qui ont effectué toute la partie de transparisation, immunomarquage et acquisition des images. Nous avons fourni des cerveaux de souris mises à mort 4 mois p.i. de fibrilles dans le Str dorsal, dans le but de vérifier que l'Ac anti- α -syn pS129 fonctionne dans ces conditions expérimentales.

La **Figure 52A** présente la propagation en 3D de la pathologie α -syn détectée par un Ac anti- α -syn pS129 selon 3 vues : dorsale, latérale et postérieure. On peut observer une propagation importante ipsilatérale et controlatérale, ainsi que dans l'axe AP, avec un marquage important des structures frontales. La pathologie α -syn pS129 est présente de manière dense autour du site d'injection (sous la flèche) ainsi que dans le Str ipsilatéral et controlatéral (**Figure 52B**). Sur la **Figure 52B** on peut observer une pathologie diffuse dans les structures corticales, plus particulièrement dense dans le cingulaire, le moteur et le somatosensoriel ipsilatéral au-dessus du site, et dans l'insulaire et le somatosensoriel controlatéral.

On constate que la pathologie est présente dans des régions anatomiquement connectées au Str. Par exemple, nous avons pu observer du marquage α -syn pS129 dans la SN sur laquelle le Str projette, en particulier la SN réticulée (SNR), comme cela était également observé grâce à l'immunomarquage DAB (**Figure 51**, AP \simeq -3,40). Comme cité ci-dessus, la pathologie est également présente dans le CI, structure sur laquelle le Str dorsal ne projette pas mais dont il reçoit énormément d'afférences, plus particulièrement du CI ant (Gehrlach et al., 2020). Ces résultats suggèrent donc que la pathologie est capable d'être transmise à des structures anatomiquement connectées au Str, de manière antérograde et rétrograde.

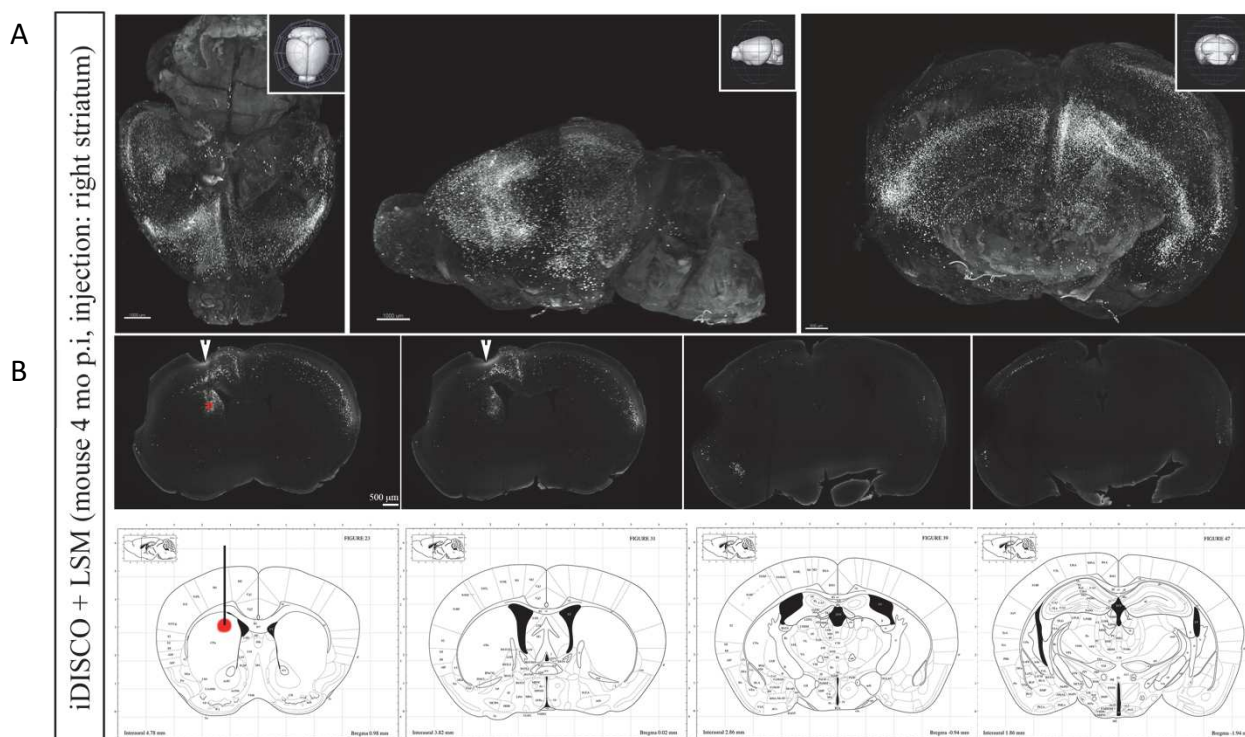


Figure 52. Pathologie α -syn pS129 4 mois p.i. de fibrilles d' α -syn dans le striatum dorsal. (A) Visualisation 3D de la propagation de la pathologie α -syn dans un cerveau transparent, grâce à un Ac dirigé contre l' α -syn pS129 : vues dorsale, latérale et caudale. **(B)** Visualisation de la pathologie α -syn pS129 sur des coupes optiques frontales, et planches d'atlas stéréotaxique correspondant approximativement au niveau d'antéropostériorité des coupes (Franklin et Paxinos, 2001).

c) Co-marquages de la pathologie α -syn pS129 avec des marqueurs neuronal (NeuN) et astrocytaire (GFAP)

Après réhydratation du cerveau transparent (**Figure 53A**), des coupes ont été réalisées et co-marquées au niveau du site d'injection (**Figure 53B**) avec des anticorps dirigés contre l' α -syn pS129, NeuN et/ou GFAP. On peut observer une co-localisation des marquages α -syn pS129 et NeuN dans le cortex et le Str à proximité du site d'injection (**Figure 53C**). Nous n'avons pas observé de co-localisation des marquages α -syn pS129 et GFAP (**Figure 53D**). Ces résultats indiquent que la pathologie α -syn se développe au sein des neurones et non des astrocytes.

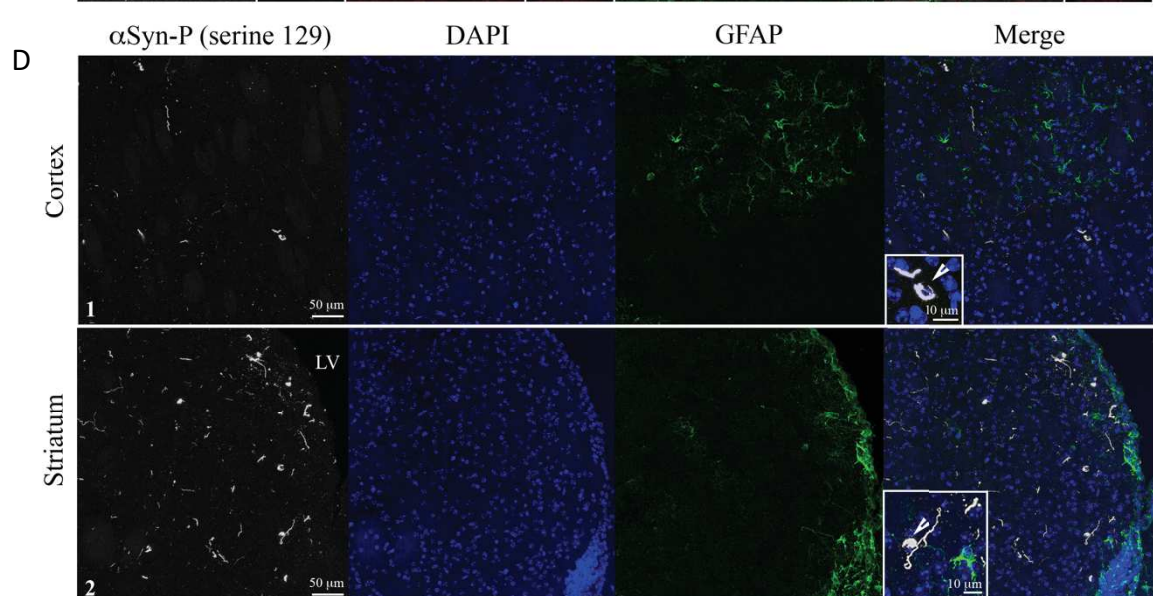
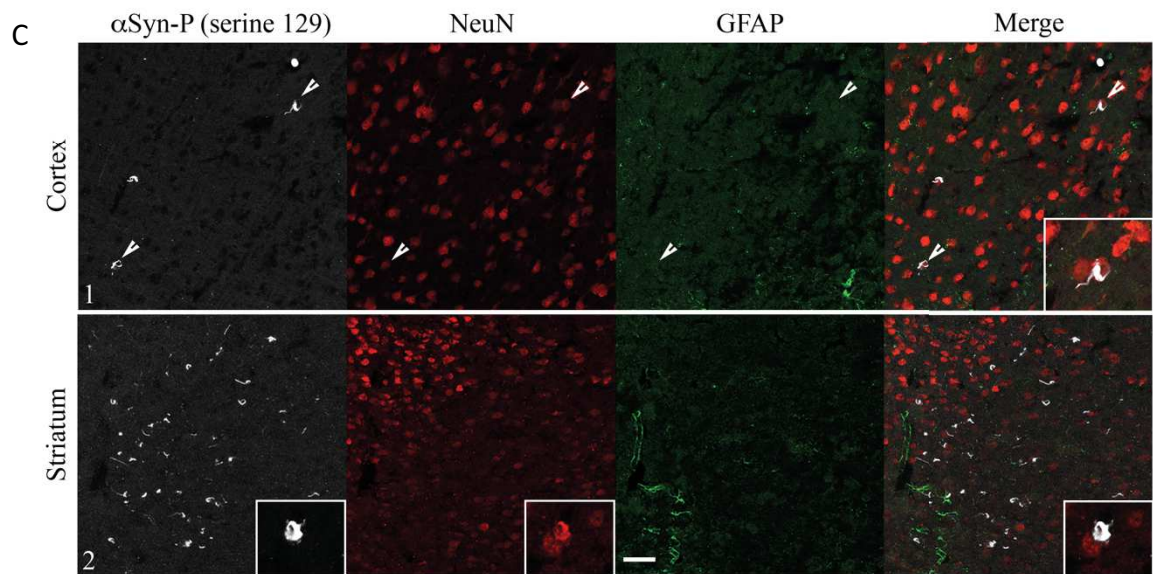
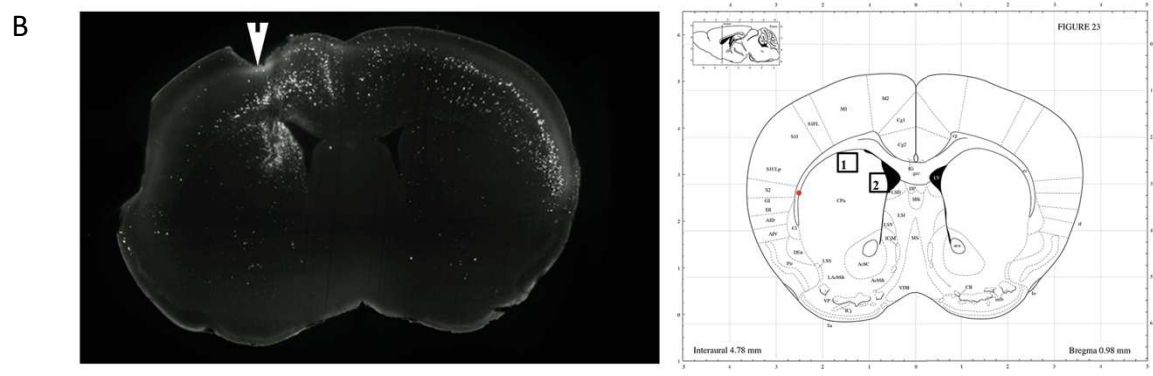
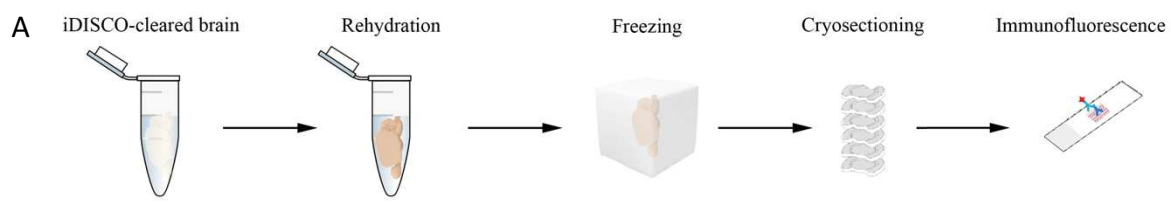


Figure 53. Comarquage α -syn pS129/GFAP 4 mois p.i. de fibrilles d' α -syn dans le striatum dorsal. (A) Processus de réhydratation du cerveau transparisé permettant d'inverser la transparisation. Le cerveau est ensuite congelé et coupé au cryostat afin d'obtenir des coupes qui peuvent alors être marquées par un protocole classique d'immunofluorescence. (B) Visualisation de la pathologie α -syn sur une coupe optique frontale de striatum permettant de visualiser le site d'injection des fibrilles, et la planche d'atlas stéréotaxique (Franklin et Paxinos, 2001) approximativement associée au niveau d'antéropostériorité de la coupe. Les cadres numérotés sur la planche permettent de localiser les zones du Str représentées sur les photographies d'immunofluorescence en (C) et (D). Co-marquages (C) α -syn pS129, NeuN et GFAP et (D) α -syn pS129, DAPI et GFAP, réalisés à proximité du site d'injection des fibrilles d' α -syn dans le Str (CPu dorsal) et le cortex situé au-dessus du site.

2. Propagation de la pathologie α -syn à partir du CI ant

a) Observation d'une propagation au sein de l'insula 4 mois p.i.

Lors de la mise au point des injections de fibrilles, nous avons injecté des fibrilles d' α -syn de manière unilatérale dans le CI ant de souris WT et SNCA, et les souris avaient été mises à mort 4 mois p.i. Ceci nous avait permis de confirmer que l'injection des fibrilles dans le CI ant entraînait une pathologie de l' α -syn endogène au niveau du site.

Nous avons également réalisé une immunohistochimie dirigée contre l' α -syn pS129 sur des coupes de cerveau distantes du point d'injection afin de voir si l'on observait une transmission de la pathologie à d'autres structures. Ainsi, peu de coupes ont été sélectionnées et les résultats présentés ici ne constituent pas une étude de propagation à proprement parlé. En sélectionnant plusieurs niveaux d'antéropostériorité, nous avons pu constater que la pathologie α -syn pS129 observée au niveau du site d'injection était également présente dans le reste de l'insula (**Figure 54**). On constate que les marquages sont essentiellement de type neurite (têtes de flèche). Au niveau du site d'injection (*), on observe une pathologie plus dense avec notamment des agglomérats de ces marquages de type neurite ou bien des neurites enchevêtrés (chevrons). On peut également observer des marquages sphériques plus denses qui pourraient être des marquages somatiques (flèches).

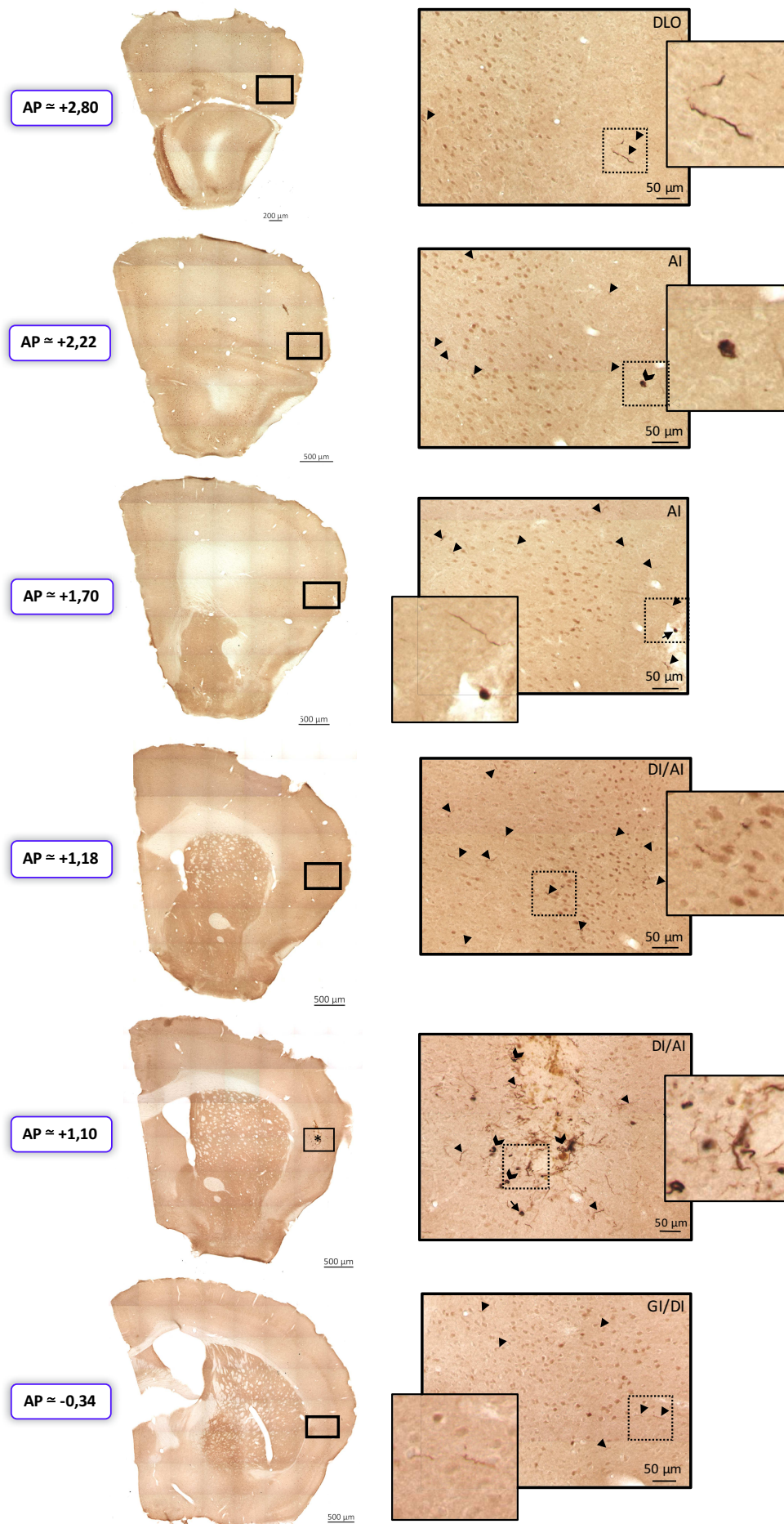


Figure 54. Propagation de la pathologie α -syn pS129 au sein du cortex insulaire 4 mois p.i. de fibrilles d' α -syn de manière unilatérale dans le CI ant de souris WT. La pathologie est détectée grâce à un Ac dirigé contre l' α -syn pS129. On observe des marquages de type neurites « isolés » (têtes de flèche) ou enroulés/agglomérés (chevrons), et de type sphérique et dense (flèches). *AI*, cortex insulaire agrulaire ; *DI*, cortex insulaire dysgranulaire ; *DLO*, cortex orbital dorsolatéral ; *GI*, cortex insulaire granulaire ; * site d'injection.

b) Visualisation en 3D de la propagation de la pathologie α -syn 7 mois p.i. et 12 mois p.i. de fibrilles d' α -syn

Afin d'identifier et d'analyser le pattern de propagation de la pathologie α -syn induite par l'injection de fibrilles d' α -syn au sein du CI ant, nous avons réalisé des injections unilatérales chez des souris WT. Les coordonnées d'injections étaient identiques à celles utilisées pour la cohorte SNCA FIB. Voici les résultats préliminaires, obtenus par immunofluorescence sur cerveaux transparisés 7 mois p.i. et 12 mois p.i. (**Figure 55**).

La première chose que l'on remarque est que la pathologie s'est propagée à la fois du côté **ipsilatéral** mais également du côté **controlatéral** au site d'injection (**Figures 55A et C**), indiqué par la flèche sur la photo et représenté par la marque rouge sur la planche d'atlas (**Figures 55B et D**). Sur la **Figure 55A**, en vues ventrale et latérale, on voit dans l'hémisphère gauche (hémisphère injecté) un marquage cortical important qui s'étale dans l'axe antéropostérieur et qui correspond à la localisation du cortex insulaire, suggérant que la pathologie est présente dans de la partie antérieure à postérieure de l'insula 7 mois p.i. Si on regarde la vue ventrale et la vue caudale, il semblerait qu'on ait le même type de marquage cortical du côté controlatéral, mais moins intense que du côté ipsilatéral, suggérant que la pathologie est également présente dans l'ensemble du cortex insulaire controlatéral. A 12 mois p.i., le marquage est beaucoup moins important dans le cortex insulaire ipsilatéral et controlatéral, mais paraît plus étendu à l'ensemble des structures cérébrales (**Figure 55C**).

Sur les coupes frontales, on constate que le corps calleux qui relie les deux hémisphères cérébraux est fortement marqué, ainsi que les commissures antérieures (**Figures 55B et D**).

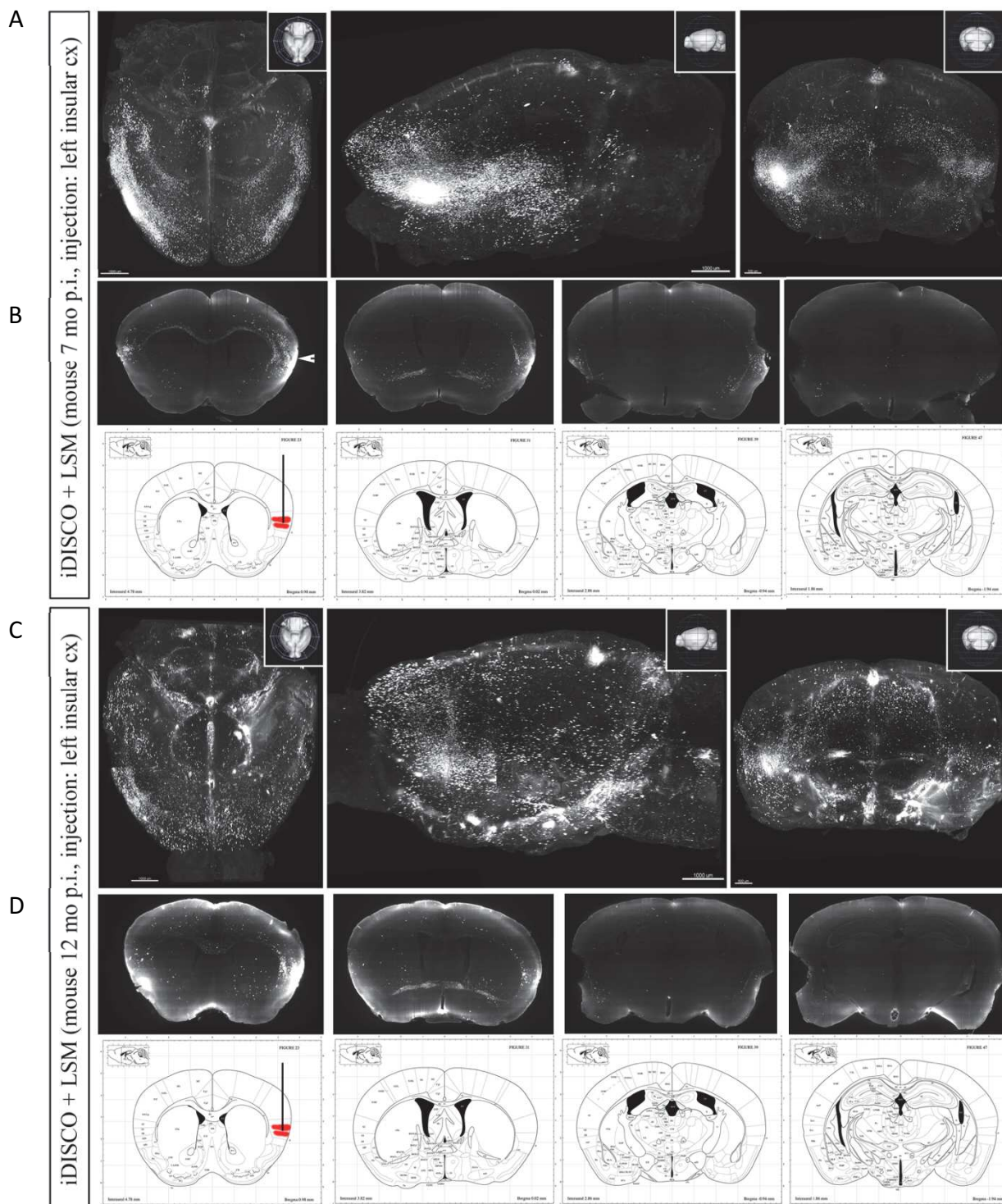


Figure 55. Pathologie α -syn pS129 7 et 12 mois p.i. de fibrilles d' $h\alpha$ -syn dans le CI ant. (A et C) Visualisation 3D de la propagation de la pathologie α -syn dans des cerveaux transparents, grâce à un Ac dirigé contre l' α -syn pS129 : vues ventrale, latérale et caudale. (B et D) Visualisation de la pathologie α -syn sur des coupes optiques frontales et planches d'atlas stéréotaxique correspondant approximativement aux niveaux d'antéropostériorité des coupes (Franklin et Paxinos, 2001).

(1) Structures cérébrales affectées par la pathologie α -syn pS129 7 mois p.i. dans le CI ant

Comme cela était suggéré par représentations 3D du cerveau, en figure 55, on observe un marquage important du CI ipsilatéral et controlatéral, jusqu'au CI agranulaire postérieur (AIP) que l'on peut voir sur la **Figure 56E**. On notera que le CI ipsilatéral est toujours un peu plus marqué. De la même manière que chez les souris SNCA 9 mois p.i., on constate que la pathologie a propagé dans des structures corticales et subcorticales, à savoir essentiellement : S1, S2, M1, M2, cortex orbitofrontal (DLO, MO, LO), CI (GI, DI, AID, AIV, AIP), Pir, PRh, Ect, Ent pour les structures corticales, et les trois principales structures subcorticales connectées au CI : Str, amygdale et thalamus (**Tableau 10**). On peut également observer du marquage dans des structures mésencéphaliques telles que le noyau du Raphé et possiblement le noyau pédonculotegmental (**Figure 56I**). Il y a très peu de marquage dans l'HD, et un peu plus dans l'HV ipsilatéral à l'injection. Presque aucun marquage n'a été observé dans le rhombencéphale, et aucun marquage n'a été observé dans le cervelet.

iDISCO + LSM (mouse 7 months p.i., injection site: left insular cx)

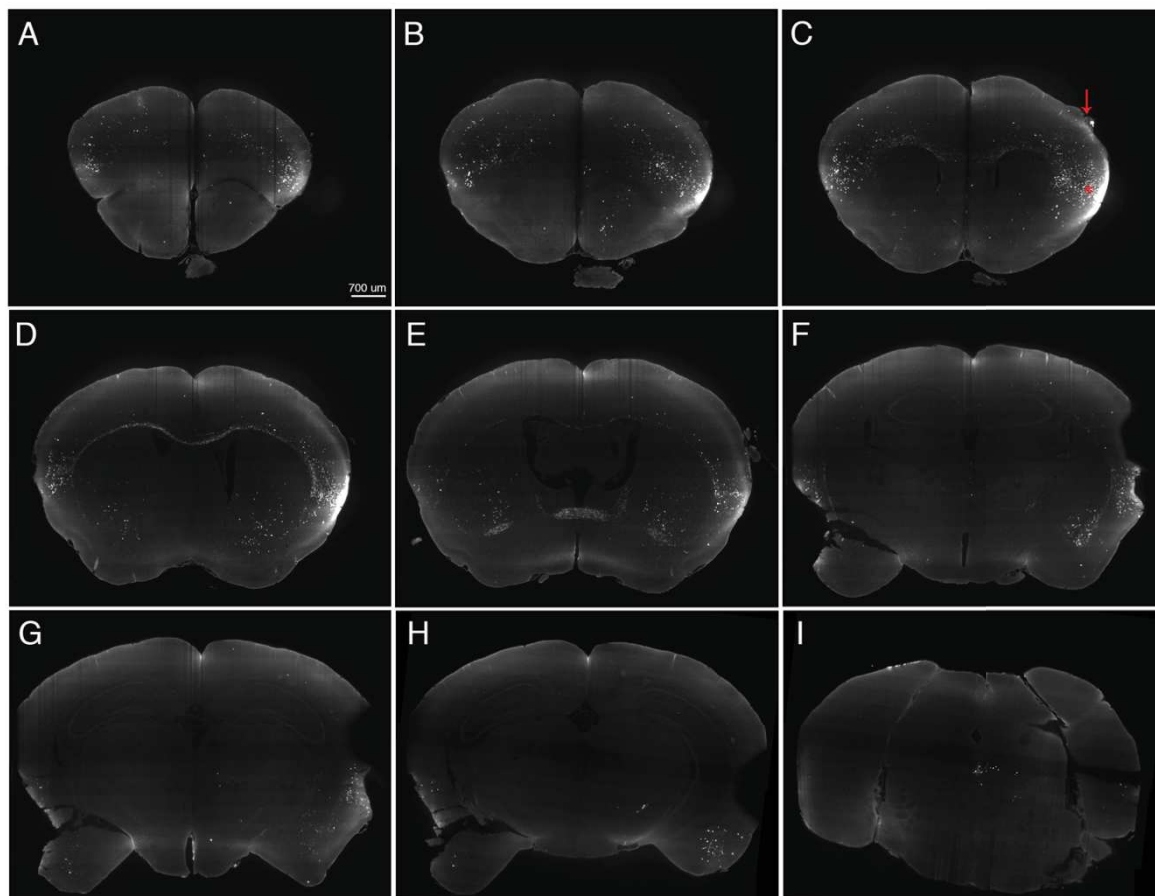


Figure	AP	Structures marquées
56		
A	+ 2,68	Cx frontal associatif (FrA) ; Cx orbitofrontal dorsolatéral (DLO)
B	+ 1,98	Cx insulaire agranulaire dorsal et ventral (AID, AIV) (Ipsi +) ; régions olfactives antérieures ipsilatérales médiale et postérieure (AOM, AOL) ; Cx somatosensoriel primaire (S1) ; Cx moteur primaire (M1) ; Cx orbitofrontal médian et latéral (MO, LO) (Ipsi +)
C	+ 1,10	Contro : Cx insulaire granulaire, dysgranulaire, agranulaire dorsal (GI, DI, AID) ; Cx somatosensoriel primaire et secondaire (S1, S2) ; Cx moteur primaire et secondaire (M1, M2) ; Striatum ventral : coquille du noyau accumbens (AcbSh)
		Ipsi : pareil que contro mais CI plus marqué ; + agranulaire ventral (AIV) ; + Cx piriforme (Pir) ; cœur du noyau accumbens (AcbC) ou caudé putamen (CPu) ventral
D	+0,74	Pareil que C pour les structures corticales + marquage important du CPu ventral et du Acb ipsi et contro
E	-0,10	S2 ; GI, DI, AIP ; CPu ventral ; strie terminale (st) et noyau du lit de la strie terminale : division médiale partie postéromédiale (STMPM) et partie intermédiaire postérieure (STMPI), division latérale partie intermédiaire (STLI) et partie postérieure (STLP), (Ipsi +)
F	-1,34	Cx périrhinal (PRh) ; Cx ectorrhinal (Ect) ; noyau thalamique submédian (Sub) ; strie terminale (st) ; noyaux amygdaliens latéral (La), basolatéral (BLA) et central (CeA)
G	-1,58	Pareil que la coupe F + noyau central médial thalamique (CM) ; noyaux thalamiques intermédiodorsal (IMD), médiodorsal MDM, paraventriculaire (PV) ; strie terminale (st) ; un marquage uniquement ipsilatéral dans le noyau hypothalamique dorsomédial (DM)
H	-2,80	Zone de transition amygdalopiriforme (APir) ; zone amygdalienne postéromédiale corticale (PMCo) ; substance noire compacte (SNC) et/ou réticulée (SNR) ipsi ; aire tegmentale ventrale, partie rostrale (VTAR) ? ipsi
I	-4,60	Noyau dorsal du Raphé, parties dorsale (DRD), ventrale (DRV), latérale (DRL), postérodorsale (PDR) ; entorhinal caudomédial (CEnt) ipsi ; noyau pédonculotegmental (PTg) ?

Tableau 10. Estimation des structures affectées par la pathologie α -syn pS129 7 mois p.i. unilatérale de fibrilles d' α -syn dans le CI ant de souris WT. La distribution de la pathologie α -syn observée sur les coupes optiques de la figure 56 est présentée dans ce tableau, ainsi que le niveau d'AP approximatif de la coupe par rapport au Bregma. AP, antéropostériorité.

Figure 56. Pathologie α -syn pS129 7 mois p.i. unilatérale de fibrilles d' α -syn dans le CI ant de souris WT. (A-I) Coupes optiques frontales du cerveau transparisé et marqué avec un anticorps dirigé contre l' α -syn pS129, à différents niveaux d'AP. Site d'injection : CI ant gauche. N = 1. Echelle : 700 μ m. AP, antéropostériorité.

(2) Structures cérébrales affectées par la pathologie α -syn pS129 12 mois p.i. dans le CI ant

A 12 mois p.i., la pathologie α -syn pS129 semble être étendue à plus de régions qu'à 7 mois p.i. (**Figure 57** et **Tableau 11**). Globalement, on peut observer plus de structures corticales atteintes, telles que le CF, avec notamment les structures du CPFm (Cg antérieur, PrL, IL) ; le Cx sensoriel avec des structures plus postérieures qu'à 7 mois p.i. comme les Cx associatifs temporal, auditif et visuel ; ainsi que le Cx Ent qui est beaucoup plus marqué qu'à 7 mois p.i. On constate également que le Str est plus largement touché, avec une atteinte du CPu dorsal, alors qu'à 7 mois p.i. la pathologie était surtout présente dans la partie ventrale. La strie terminale, qui constitue la sortie majeure des noyaux amygdaliens vers le thalamus et le septum, est également plus marquée. Bien que l'hippocampe ne présente toujours pas de pathologie majeure, on peut observer un peu plus de marquage dans l'HD, mais toujours d'avantage dans l'HV ipsilatéral (non observable sur la figure 57). On peut également ajouter que le mésencéphale est globalement plus marqué qu'à 7 mois p.i., ainsi que le rhombencéphale et le cervelet qui ne présentaient quasiment aucune pathologie.

iDISCO + LSM (mouse 12 months p.i., injection site: left insular cx)

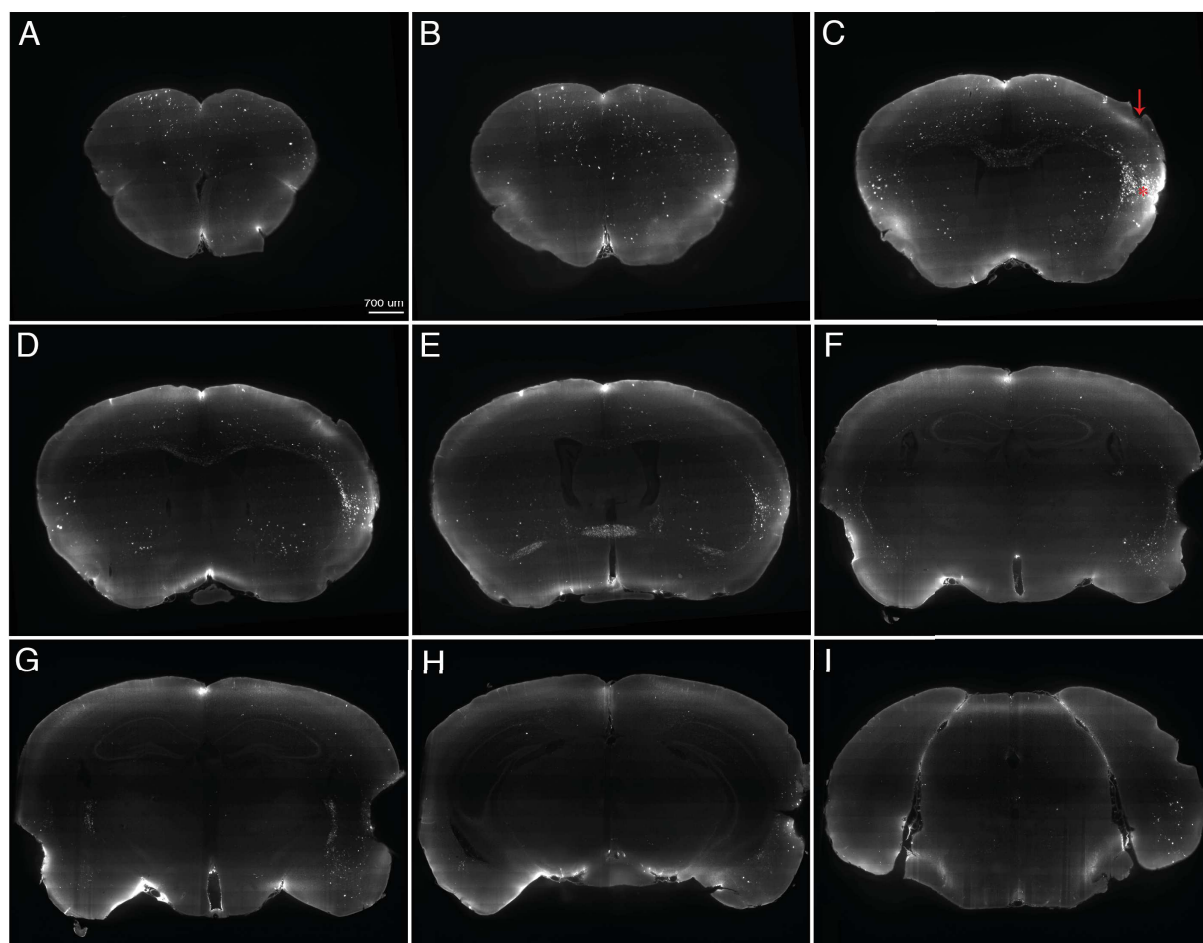


Figure 57. Pathologie α -syn pS129 12 mois p.i. unilatérale de fibrilles d' α -syn dans le CI ant de souris WT. (A-I) Coupes optiques frontales du cerveau transparentisé et marqué avec un anticorps dirigé contre l' α -syn pS129, à différents niveaux d'AP. Site d'injection : CI ant gauche. N = 1. Echelle : 700 μ m. AP, antéropostériorité.

Tableau 11. Estimation des structures affectées par la pathologie α -syn pS129 12 mois p.i. unilatérale de fibrilles d' α -syn dans le CI ant de souris WT. La distribution de la pathologie α -syn observée sur les coupes optiques de la figure 57 est présentée dans ce tableau, ainsi que le niveau d'AP approximatif de la coupe par rapport au bregma. Les structures écrites en gras sont les structures qui n'étaient pas marquées sur les coupes au niveau d'AP correspondant à 7 mois p.i. AP, antéropostériorité.

Figure 57 AP Structures marquées

A	+ 2,68	Cx frontal associatif (FrA) ; Cx orbitofrontal dorsolatéral, médial, ventral, latéral (DLO, MO, VO, LO) ; Cx prélimbique (PrL) + régions olfactives antérieures ipsilatérales (GrO, AOM, AOV)
B	+ 1,98	Régions olfactives antérieures médiale et postérieure (AOM, AOP) ; claustrum endopiriforme dorsal (DEn) ; Cx piriforme (Pir) ; Cx insulaire agranulaire dorsal et ventral (AID, AIV) ; Cx somatosensoriel primaire (S1) ; Cx moteur primaire et secondaire (M1, M2) ; Cx frontal associatif 3 (Fr3) ; Cx orbitofrontal médian, latéral, ventral (MO, LO, VO) ; Cx préfrontal médian (prélimbique PrL, infralimbique IL, cingulaire, Cg) Ipsi : pareil que contro + Taenia tecta dorsal (DTT) ; claustrum endopiriforme intermédiaire (IEn) ; cortex pédonculaire dorsal (DP)
C	+ 1,10	Cx insulaire granulaire, dysgranulaire, agranulaire dorsal, agranulaire ventral (GI, DI, AID, AIV) ; Cx somatosensoriel primaire et secondaire (S1, S2) ; Cx moteur primaire et secondaire (M1, M2) ; Striatum : cœur et coquille du noyau accumbens (AcbC, AcbSh), caudé putamen (CPu) ; Cx piriforme (Pir) ; claustrum endopiriforme dorsal (DEn) ; claustrum (Cl) ; cortex cingulaire primaire et secondaire (Cg1, Cg2) + faisceau médian du prosencéphale ipsilatéral (mbf)
D	+0,74	Pareil que C, moins le claustrum endopiriforme dorsal (DEn) et le faisceau médian du prosencéphale (mbf)
E	-0,10	Ipsi : Cx insulaire granulaire, dysgranulaire et agranulaire postérieur (GI, DI, AIP) ; CPu ventral et dorsal ; strie terminale (st) et noyau du lit de la strie terminale : division médiale partie postéromédiale (STMPM) et partie intermédiaire postérieure (STMPI), division latérale partie intermédiaire (STLI) et partie postérieure (STLP) ; cortex somatosensoriel primaire et secondaire (S1, S2) ; cortex moteur primaire et secondaire (M1, M2) ; cortex cingulaire primaire et secondaire (Cg1, 2) Contro : pareil qu'ipsi mais sans le Cx insulaire agranulaire postérieur (AIP), et somatosensoriel et moteur moins marqués
F	-1,34	Noyaux amygdaliens latéral (La), basolatéral (BLA) et central (CeA) ; Cx périrhinal (PRh) ; Cx ectorhinal (Ect) ; strie terminale (st) ; caudé putamen (CPu) ; noyaux thalamiques intermédiodorsal (IMD), réunis et rhomboïde (Re, Rh) ? ; Cx rétrospécial dysgranulaire (RSD) ; hippocampe (couche moléculaire lacunosum (LMol) ?)
G	-1,58	Ipsi : Cx somatosensoriel (S1) ; Cx associatif pariétal médial (MPtA) ; Cx périrhinal (PRh) ; Cx entorhinal (Ect) ; Strie terminale (st) ; noyaux amygdaliens latéral (La), basolatéral (BLA), central (CeA) et basomédial (BMP) ; zone amygdalopiriforme (RAPir) ; noyaux thalamiques intermédiodorsal (IMD) et central médial (CM) ; hypothalamus latéral, partie postérieure (PLH) ? Contro : pareil qu'ipsi, mais sans : les noyaux amygdaliens central (CeA) et latéral (La) ; la zone amygdalopiriforme (RAPir) ; l'hypothalamus latéral, partie postérieure (PLH)
H	-2,80	Ipsi : Cx associatif temporal (TeA) ; Cx piriforme (Pir) ; Cx visuel secondaire, partie latérale (V2L) ; Cx auditif secondaire, partie ventrale (AuV) ; Cx périrhinal (PRh) ; Cx ectorhinal (Ect) ; Cx entorhinal dorsolatéral (DLEnt) ; Zone de transition amygdalopiriforme (APir) ; aire tegmentale ventrale (VTA) ? Contro : Cx associatif temporal (TeA) ; Cx piriforme (Pir) , hippocampe (couche moléculaire lacunosum (LMol) ?)

/	-4,60	<p>Ipsi : Cx entorhinal caudomédial (CEnt), médial (MEnt), dorsolatéral (DLEnt) ; Cx visuel secondaire, partie latérale (V2L) ; Cx périrhinal (PRh) ; noyau dorsal du Raphé, partie ventrale (DRV) ; <i>noyau pédonculotegmental (PTg) ?</i> ; noyau réticulaire pontique (PnO) ; substance grise périaqueducale, partie ventrolatérale (VLPAG) ; cortex externe du colliculus inférieur (ECIC)</p> <p>Contro : Cx entorhinal caudomédial (CEnt), médial (MEnt), dorsolatéral (DLEnt) beaucoup moins marqué que côté ipsi ; Cx visuel primaire (V1) ; noyau dorsal du Raphé, partie ventrale (DRV) ; <i>noyau pédonculotegmental (PTg) ?</i> ; noyau réticulaire pontique (PnO) ; substance grise périaqueducale, partie ventrolatérale (VLPAG) ; cortex externe du colliculus inférieur (ECIC) ; couche de matière grise intermédiaire du colliculus supérieur (InG)</p>
---	-------	---

VIII. Discussion – Partie II

La découverte de pathologie de type Lewy dans un greffon implanté dans le striatum d'un patient atteint de MP, 14 ans après la transplantation, a mis en avant l'hypothèse selon laquelle la pathologie α -syn pouvait se propager de cellule à cellule au cours de la maladie (Kordower et al., 2008 ; Li et al., 2008). L'évolution de la pathologie au sein du cerveau de patients atteints de MP, décrite par Braak, suggère que la propagation a lieu via les voies neuronales (Braak et al., 2003). A ce jour, un grand nombre d'études de propagation de la pathologie α -syn a été publié. En effet, des injections de diverses formes d' α -syn (fibrilles d' α -syn recombinante humaine ou murine, mutée ou non, forme entière ou forme tronquée ; homogénats de cerveaux de patients atteints de MP, MCL ou AMS ; homogénats de cerveaux de modèles murins au stade symptomatique) ont été réalisées dans le Str, la SN, l'hippocampe, le cortex ou encore les BO de souris (Luk et al., 2012a, 2012b ; Masuda-Suzukake et al., 2013 ; Sacino et al., 2013, 2014 ; Watts et al., 2013 ; Recasens et al., 2014 ; Rey et al., 2016, 2018). Elles résultent toutes en la propagation diffuse de pathologie α -syn dans le cerveau mais avec un pattern différent selon le site d'injection (Chung et al., 2019). Ces études ont un double intérêt : à la fois tenter de modéliser l'une ou l'autre synucléinopathie, mais aussi étudier la propagation de cellule à cellule de l' α -syn. En effet, l'injection de fibrilles à un endroit donné permet d'avoir une bonne résolution spatiale et temporelle pour l'étude de la propagation (Volpicelli-Daley et al., 2016). A ce jour, aucune étude ne décrit la propagation à partir du cortex insulaire de la souris.

A. Propagation de la pathologie α -syn pS129

1. Propagation diffuse de la pathologie α -syn pS129 dans le cerveau à partir de l'injection de fibrilles dans le CI ant de souris WT

Nos premiers résultats d'injections unilatérales de fibrilles d' α -syn humaine non mutée dans le CI ant de souris WT montrent une propagation **importante**, **diffuse**, et **bilatérale** de la pathologie, 7 mois et 12 mois p.i. La propagation bilatérale était également observée dans le cas de l'injection de fibrilles d' α -syn recombinante humaine dans le BO (Rey et al., 2016, 2018), dans le Str (Karampetsou et al., 2017) et dans la SN (Masuda-Suzukake et al., 2013) de souris WT.

On observe un marquage important du corps calleux 7 mois et 12 mois après l'injection de fibrilles dans le CI ant, indiquant la présence de pathologie dans les axones connectant les deux hémisphères. Ceci est en accord avec la propagation importante de la pathologie à l'hémisphère controlatéral que nous observons, particulièrement au sein du CI à 7 mois. De plus, la commissure antérieure apparaît très marquée dès 7 mois p.i., ainsi que la strie terminale, structure également constituée de fibres et principale sortie de l'amygdale, surtout à 12 mois p.i. Ces marquages importants dans les axones sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle la pathologie α -syn pourrait être transmise via les connexions neuronales (Braak et al., 2003b ; Luk et al., 2012b ; Rey et al., 2016, 2018 ; Karampetsou et al., 2017). Le marquage du corps calleux et de la strie terminale avait aussi été observé 15 mois p.i de fibrilles dans la SN (Masuda-Suzukake et al., 2013), et les souris présentaient également une pathologie bilatérale.

La pathologie est présente de la partie antérieure jusqu'à la partie postérieure du cortex insulaire, et particulièrement dense du côté ipsilatéral. Il existe un grand nombre de **connexions intra-insula**, et plus particulièrement beaucoup de projections du cortex postérieur vers le cortex antérieur plutôt que l'inverse (Gehrlach et al., 2020). D'autre part, on constate que la pathologie s'est propagée dès 7 mois p.i. dans des **structures directement connectées** au CI ant : 1) soit de manière réciproque comme les cortex moteur, somatosensoriel, orbitofrontal et olfactif, et l'amygdale et le thalamus) ; 2) soit non réciproque comme par exemple le Str qui reçoit des projections du CI mais n'en envoie pas (Gogolla, 2017; Gehrlach et al., 2020).

L'hippocampe et le CPFm sont très peu touchés par la pathologie 7 mois p.i. Ils présentent plus de pathologie à 12 mois p.i., surtout dans le CPFm et dans l'hippocampe ventral. De manière intéressante, on constate que le cortex insulaire n'est presque pas connecté au CPFm : moins de 0,5 % des afférences excitatrices et moins de 0,5 % des afférences inhibitrices de la partie la plus antérieure proviennent du CPFm, et 1 % des afférences totales de cette partie vont au CPFm. Il en va de même pour le reste du CI, avec un peu plus de projections sur le CPFm provenant de la partie médiane du CI (environ 1,5 %) (Gehrlach et al., 2020). *Dans notre modèle, le site d'injection des fibrilles est situé à la limite entre les parties définies comme antérieure et médiane dans l'étude de Gehrlach et collaborateurs.* L'hippocampe quant à lui envoie des projections excitatrices sur les parties antérieure et médiane du CI (respectivement 2,5 % et 1,5 % des entrées excitatrices totales)

et reçoit environ 1,15 % des sorties excitatrices totales de la partie médiane du CI. Les afférences provenant de l'hippocampe représentent 2,5 % de toutes les entrées inhibitrices du CI postérieur et 0,8 % environ des entrées excitatrices. Le Str par exemple présente beaucoup de pathologie α -syn pS129 dès 7 mois p.i. et il s'agit d'une des structures subcorticales majoritairement connectées au CI. En effet, 31,8 % de toutes les sorties de la partie antérieure du CI projettent sur le Str, majoritairement sur le CPU (Gehrlach et al., 2020). L'ensemble de ces informations est donc également en faveur de l'hypothèse selon laquelle la pathologie α -syn propage via les voies neuronales (Luk et al., 2012a, 2012b ; Rey et al., 2013), puisqu'on constate une pathologie importante présente dans des régions fortement connectées au CI, et une pathologie beaucoup plus faible dans celles qui lui sont peu connectées. D'autre part, on peut déduire des structures affectées que la transmission des formes pathologiques de l' α -syn peut se faire de manière rétrograde ou antérograde.

L'insula étant une structure hautement connectée, et les structures majeures interconnectées étant positives à l' α -syn pS129, il est difficile d'estimer à ce stade de la propagation déjà bien avancé s'il y a eu des propagations polysynaptiques. Ce phénomène a pu être observé avec de l'injection de fibrilles d' α -syn humaine dans le BO de souris WT (Rey et al., 2016). La pathologie s'est propagée jusqu'à des structures distantes de deux à trois synapses 3 mois et 12 mois p.i. respectivement. Ce type de propagation expliquerait d'ailleurs pourquoi la pathologie se propage progressivement jusqu'à l'ensemble du cerveau dans les maladies neurodégénératives. D'autres hypothèses de propagation peuvent être soulevées, telles que la propagation via des cellules qui peuvent migrer, comme la microglie. Cependant cela n'expliquerait pas pourquoi la pathologie apparaît dans des structures interconnectées au CI ant, plutôt qu'essentiellement autour du site d'injection.

Dans notre modèle on constate qu'à 12 mois la pathologie est plus étendue qu'à 7 mois p.i., au CPFm et à l'hippocampe, mais également à des structures corticales supplémentaires telles que le cortex temporal associatif, le cortex visuel et le cortex auditif. La pathologie est également plus importante dans le mésencéphale, notamment dans le Cx Ent, et dans le rhombencéphale et le cervelet. De manière intéressante, le marquage de l' α -syn pS129 paraît moins dense dans le CI 12 mois p.i. en comparaison à 7 mois p.i. Cependant, aucune quantification n'a été réalisée et aucun score de pathologie n'a été attribué à partir de ces résultats préliminaires, ne permettant donc pas d'affirmer qu'il y a eu une diminution

de la sévérité de la pathologie à 12 mois p.i. L'étude de la propagation des fibrilles à partir du BO réalisée par Rey et collègues (Rey et al., 2018) a été faite sur de longs délais p.i. (jusqu'à 23 mois p.i.), et a montré qu'entre 12 et 18 mois p.i., la pathologie avait progressé vers de nouvelles régions cérébrales. Cependant à 18 puis 23 mois p.i., certaines régions qui étaient affectées à des délais plus courts, présentaient soit une diminution de sévérité de la pathologie, soit une disparition de celle-ci. Il est possible que la régression de l'étendue de la pathologie puisse être due à la capacité de certaines régions peu affectées à utiliser de manière efficace les mécanismes de clairance, comme les systèmes autophagie-lysosome ou ubiquitine-protéasome (Xilouri et al., 2013). Il se peut également que les neurones affectés par la pathologie dégénèrent et meurent, et que les débris soient alors phagocytés par la microglie, résultant en une diminution de la densité de pathologie α -syn pS129 (Osterberg et al., 2015 ; Rey et al., 2018).

Ces résultats de propagation sont à confirmer sur d'autres cerveaux qui seront contremarqués avec un marqueur nucléaire (DAPI) ou immunomarqués avec d'autres marqueurs (par exemple, TH), afin de mieux visualiser et délimiter les structures cérébrales affectées par la pathologie. En effet, les résultats préliminaires présentés ici permettent d'estimer la localisation de la pathologie de manière plutôt grossière, et il est possible que certaines structures aient été mal identifiées, certaines n'ayant d'ailleurs pas été identifiées, souvent du fait de leur petite taille. Les structures seront plus précisément identifiables sur les coupes frontales qui seront réalisées à partir de ces cerveaux transparisés.

2. Propagation de la pathologie α -syn chez les souris SNCA 9 mois après l'injection bilatérale de fibrilles dans le CI ant

Comme cela a pu être observée sur la cartographie de la propagation, on constate que les régions affectées par la pathologie α -syn pS129, 9 mois après l'injection bilatérale de fibrilles dans le CI ant de souris SNCA, sont nombreuses et sont des structures connectées aux CI ant. On observe en fait le **même pattern de propagation de la pathologie** que chez les souris WT à 7 et 12 mois p.i. On ne peut cependant pas directement comparer la propagation observée chez les WT à celle observée chez les SNCA car les injections ont été réalisées de manière unilatérale pour les WT, et bilatérale pour les SNCA, et la propagation a été observée

à 7 et 12 mois p.i. chez les souris WT et à 9 mois p.i. chez les souris SNCA. De plus la pathologie a été observée en 3D et sur des coupes optiques frontales en immunofluorescence chez les WT, et par immunohistochimie DAB chez les souris SNCA.

La sévérité et l'étendue de la pathologie ne sont pas les mêmes chez toutes les souris SNCA ayant subi les injections bilatérales de fibrilles dans le CI ant. En effet, comme expliqué dans les résultats seulement 2 souris sur les 11 présentent cette pathologie relativement sévère et étendue décrite sur la cartographie. Plusieurs paramètres pourraient être en cause de cette différence interindividuelle dans la propagation de la pathologie : 1) la quantité de fibrilles injectées a pu sensiblement différer suivant les souris ; 2) le site d'injection n'est pas à la bonne place ; 3) les fibrilles et les formes pathologiques induites par ces dernières ont été dégradées.

Les fibrilles ont été injectées directement avec une seringue hamilton neuro de 2 μ l et non pas avec un système de cathéter qui pourrait contenir une bulle d'air et expliquer une erreur dans le volume injecté. La seule manière pour que le volume injecté ne soit pas le bon est que les 2 μ l n'aient pas été prélevées correctement dans le tube eppendorf contenant les fibrilles (fin de l'aliquot par exemple). Il est très peu probable que ceci explique la faible pathologie induite chez autant de souris. En vérifiant les sites d'injection sur l'ensemble de ce souris, j'ai constaté qu'ils étaient majoritairement tous dans le CI, et lorsqu'une injection avait été réalisé un peu trop haute (à la limite du cortex insulaire et du somatosensoriel) ce n'était jamais le cas du deuxième point d'injection. Ainsi cela ne semble pas pouvoir justifier le peu de pathologie observée chez les 9 autres souris. La dernière hypothèse selon laquelle les fibrilles pourraient être dégradées par les système autophagie-lysosome ou ubiquitine-protéasome reste donc la meilleure.

En effet, il est possible que les souris SNCA, surexprimant l' α -syn humaine non mutée, aient mis en place des mécanismes de dégradation plus efficaces que ceux des souris WT pour lutter contre l'effet de la surexpression, et que ceux-ci aient été efficaces pour dégrader les formes pathologiques injectées et/ou induites. Ceci implique qu'il aurait peut-être fallu tester les souris à un temps p.i. plus précoce. Cependant, ceci n'a pas été décrit dans littérature. Au contraire même, l'injection de fibrilles recombinantes d' α -syn humaine réalisée dans le Str de souris WT ou surexprimant l' α -syn humaine WT (lignée M20) entraîne une pathologie plus importante chez les souris transgéniques (Sorrentino et al., 2017). Dans une étude faite chez

le rat, l'expression d' α -syn par vecteur viral, 10 jours avant l'injection de fibrilles d' α -syn humaine dans la SN, a augmenté la capacité des fibrilles à induire la pathologie endogène, et seulement 10 jours p.i. les rats présentaient une pathologie α -syn sévère, une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN, et un phénotype comportemental de type MP (Thakur et al., 2017).

3. La pathologie peut être initiée en dehors du CI ant

Il est important de noter que dans l'ensemble des chirurgies effectuées sur les souris WT et SNCA, il y a forcément eu une remontée des fibrilles injectées le long de la trace d'injection. Ces remontées dans les structures dorsales au CI ant (le S1 et le S2) génèrent donc des sites de nucléation de la pathologie α -syn dans ces régions corticales. De ce fait, nous ne pouvons pas exclure que la pathologie observée chez les souris WT et SNCA ne soit pas liée en partie à la propagation à partir des cortex S1 et S2. En effet, outre les nombreuses connexions au sein des différentes sous régions du cortex somatosensoriel, il existe également un bon nombre de connexions avec d'autres structures cérébrales comme le thalamus, le noyau cunéiforme ou l'amygdale (Kropf et al., 2018), ainsi qu'avec le CI comme cela a été décrit précédemment (Kropf et al., 2018 ; Gehrlach et al., 2020). Une partie du S2 projette également sur l'hippocampe, qui n'est pas très connectée avec le CI. Dans nos modèles d'injection de fibrilles, nous n'observons d'ailleurs pas ou presque pas de transmission de la pathologie dans l'hippocampe. Ceci renforce l'aspect spécifique de notre site d'injection, même si cet argument n'est pas suffisant pour exclure qu'il a pu y avoir propagation de pathologie à partir du S2.

4. Caractérisation de la pathologie induite par les fibrilles

Les fibrilles α -syn humaine que nous avons injectées dans le CI ant de nos souris sont non phosphorylables. Comme nous avons détecté la pathologie avec un Ac dirigé contre l' α -syn pS129, nous sommes certains que la pathologie détectée est constituée d' α -syn endogène (i.e. murine dans le cas des souris WT et murine et humaine dans le cas des souris SNCA). Cependant, la pathologie a uniquement été détectée par un anticorps dirigé contre l' α -syn pS129, et même si elle est considérée comme marqueur des synucléinopathies, cela ne suffit

pas pour dire que la pathologie est de type Lewy. Afin de savoir si cette pathologie présente les caractéristiques des CL ou des NL, il faudrait réaliser un comarquage de l' α -syn pS129 avec p62 (récepteur autophagique), ubiquitine (marqueur de protéines à envoyer au protéasome), ou un anticorps spécifique de conformation pathologique de l' α -syn. On peut également réaliser un marquage Thioflavine S afin de vérifier si l' α -syn est sous forme de feuillet β dans les inclusions, et vérifier leur caractère insoluble par un traitement à la protéinase K par exemple (Tanji et al., 2010).

Pour déterminer si la pathologie observée est de type Lewy, et en accord avec notre volonté de modéliser une maladie de type MCL, il faudra également vérifier que les inclusions soient localisées majoritairement dans les neurones. Pour cela des comarquages NeuN seront réalisés, ainsi que des co-marquages GFAP, Iba1, et Olig2 afin de vérifier que la pathologie se trouve respectivement dans les neurones et non dans les astrocytes, la microglie ou les oligodendrocytes. Les résultats sur cerveaux transparisés obtenus lors de la mise au point par injection de fibrilles dans le Str ont montré que l' α -syn pS129 co-localisait avec NeuN, et pas avec la GFAP (**Figure 53**), indiquant que la pathologie a été observée dans les neurones et pas dans les astrocytes. On peut s'attendre à observer les mêmes résultats chez les souris WT injectées dans le CI ant puisque les mêmes fibrilles ont été utilisées, et la propagation à partir du Str et du CI ant semble se faire de la même manière : entre des régions interconnectées de manière rétrograde ou antérograde. La localisation de la pathologie dans les neurones plutôt que dans des cellules gliales constituerait un argument supplémentaire pour la propagation via les fibres neuronales.

B. Aucune altération comportementale n'est induite par l'injection de fibrilles dans le CI ant chez les souris SNCA FIB

Le CI est une région hautement connectée et constitue un centre d'intégration important au sein du cerveau. En s'appuyant sur l'hypothèse que la pathologie α -syn puisse être transmise via les connexions neuronales, afférences et efférences, nous nous attendions à observer une pathologie diffuse dans de nombreuses structures cérébrales, associées à des déficits comportementaux importants, incluant notamment, ceux dépendants du cortex insulaire. Le but de l'étude développée dans cette seconde partie de thèse était donc

d'aggraver le phénotype cognitif des souris SNCA en injectant directement des fibrilles dans le CI ant, structure récemment décrite comme étant une des premières structures atteintes dans les stades prodromaux de la MCL (Blanc et al., 2014, 2015, 2016 ; Roquet et al., 2017). Cependant, la pathologie α -syn initiée par l'injections de fibrilles dans notre modèle, bien qu'ayant propagé dans les structures connectées, ne semble pas avoir induit de modification du phénotype comportemental des souris SNCA âgées de 12-14 mois (7-9 mois p.i.). Bien entendu chez la plupart des souris la pathologie n'est pas sévère, mais les déficits cognitifs ne semblent pas corrélés à l'intensité de la pathologie, puisque les deux souris avec la pathologie la plus sévère ne sont pas les plus déficientes dans les tâches comportementales.

Concrètement, deux hypothèses peuvent être envisagées : 1/ les paramètres de notre étude ne nous ont peut-être pas permis de détecter de déficits qui pourraient être présents, et ce pour plusieurs raisons, comme le choix des tests comportementaux, les délais post-injection ou encore un effet compensateur développé dans le modèle qui surexprime déjà de l' α -syn et 2/ la présence des fibrilles pathologiques ne corrèle peut-être pas clairement avec les dysfonctionnements cognitifs observés dans la pathologie.

1. Discussion des paramètres de l'étude

a) Choix des tests comportementaux

A posteriori, à la vue de la propagation de la pathologie α -syn pS129 observée chez les souris SNCA, mais également chez les souris WT, nous pensons qu'il aurait été plus intéressant de réaliser des tests impliquant d'autres structures cérébrales, complémentaires à ceux que nous avons réalisés. En effet, dans un souci de reproduire les tests réalisés pour la caractérisation de notre modèle SNCA, nous avons soumis les souris SNCA FIB à des tâches comportementales sous tendues essentiellement par l'hippocampe dorsal et le CPFm, ainsi que les cortex périrhinal et entorhinal latéral. Les tests comportementaux que nous avons utilisés afin de caractériser les SNCA FIB n'étaient pas forcément adaptés. Il aurait pu être judicieux de réaliser des tests dépendants du Str d'une part, et plus particulièrement du Str ventral (Acb), et de l'amygdale d'autre part, deux structures qui montrent quantité de fibrilles pathologiques dans les études de propagation. Nous aurions donc pu réaliser un test de dépendance au sucrose par exemple pour évaluer la fonction du système de récompense, et réaliser une tâche de conditionnement de peur qui fait intervenir l'amygdale.

b) Délai post-injection

Nous avons pu observer ce qui pourrait être une diminution de la densité de la pathologie chez les souris WT entre 7 et 12 mois p.i. Il est possible que la pathologie induite chez les souris SNCA était plus importante avant 7 mois et qu'à ce moment-là des déficits comportementaux auraient pu être détectés. Cependant la pathologie décrite chez deux des souris semblait sévère et ces souris ne présentaient pas les déficits comportementaux les plus importants. Il est également possible qu'au bout de 7 mois p.i. les souris aient mis en place des systèmes de compensation fonctionnelle et qu'elles puissent réaliser les tâches comportementales qu'elles n'auraient peut-être pas pu réaliser à un délai p.i plus court.

Une autre hypothèse est qu'à 7 mois p.i. la pathologie observée chez les souris SNCA FIB n'est pas mature. Au stade le moins mature, les inclusions sont de type neurite, puis elles évoluent pour progresser des prolongements vers le corps cellulaire afin d'y former des inclusions immatures, avant de former des inclusions somatiques matures (Osterberg et al., 2015). Chez les souris SNCA FIB, la pathologie décrite après la caractérisation comportementale, c'est à dire 9 mois p.i., est essentiellement sous forme de neurites. Dans ce cas, il faudrait alors caractériser les souris à un délai plus long que 7 mois p.i.

c) Effet de la surexpression chronique de l' α -syn

Dans un premier temps, il est possible que la surexpression d' α -syn humaine par le modèle SNCA leur ait permis de mettre en place des systèmes plus efficace de clairance, et que de ce fait il y ait une dégradation importante des protéines pathologiques induites par les injections de fibrilles.

Il est également possible que cette surexpression ait induit des mécanismes de compensation au niveau comportemental. Dans ce cas, les souris SNCA seraient capables de mobiliser d'autres aires cérébrales afin de compenser les déficits fonctionnels des structures normalement mises en jeu. Il aurait fallu avoir un groupe test supplémentaire, à savoir un groupe de souris WT qui auraient également subi des injections bilatérales de fibrilles d' α -syn humaine dans le CI ant. Cela nous aurait permis d'analyser uniquement les effets de l'induction et de la propagation de la pathologie à partir du CI ant, sans qu'un autre paramètre n'entre en jeu.

Nous nous attendions cependant à ce que la surexpression d' α -syn humaine dans notre modèle induise une potentialisation de la pathologie induite chez les SNCA FIB. En effet, dans

le modèle de Thakur et collaborateurs qui exprimait l' α -syn humaine par vecteur viral, l'injection de fibrilles d' α -syn humaine dans la SN a induit une pathologie α -syn importante, ainsi qu'un phénotype comportemental de type MP au bout de 10 jours p.i. seulement (Thakur et al., 2017).

2. Relation entre présence de la pathologie α -syn et dysfonctionnement cognitif

a) Les données de la littérature chez l'Homme

La caractéristique neuropathologique des synucléinopathies est la présence de CL et de NL. L'idée selon laquelle la localisation spécifique de ces agrégats dans certaines régions cérébrales serait directement liée à l'apparition de certains symptômes est à ce jour encore controversée (Schulz-Schaeffer, 2010 ; Davis et al., 2018). Certaines études décrivent des corrélations entre les signes cliniques présentés par les patients et des structures cérébrales affectées par la pathologie : l'atteinte cognitive majeure (ACM) et les CL corticaux (Mattila et al., 2000 ; Harding et Halliday, 2001 ; Schneider et al., 2012), le syndrome parkinsonien et les CL dans la substance noire (Braak et al., 2003b), les hallucinations visuelles et les CL du noyau amygdalien basolatéral dans la MP (Harding et al., 2002), les troubles mnésiques dans la MCL et les CL dans CA1 (Adamowicz et al., 2017b), ou encore les troubles visuo-spatiaux et la pathologie de type limbique (Schneider et al., 2012). Selon Kövari et collègues, la densité des CL dans les cortex entorhinal et cingulaire antérieur prédirait l'apparition des déficits cognitifs dans la MP (Kövari et al., 2003). Il a également été observé chez des patients atteints de MCL, que plus la densité de la pathologie Lewy était importante, plus la pathologie était courte (début du déclin cognitif à la mort du patient) (Ferman et al., 2018).

D'autre part, des études ont montré que la présence de pathologie α -syn dans les neurones de la SN ne corrélait pas nécessairement avec leur dégénérescence dans la MP (Iacono et al., 2015), ni avec la présence du syndrome extrapyramidal (Parkkinen et al., 2005). De même, la présence de CL corticaux n'est pas forcément corrélée avec le développement d'une ACM (Colosimo et al., 2003 ; Parkkinen et al., 2005 ; Horvath et al., 2013). Ces résultats, ne montrant pas de corrélation entre la présence de CL et le développement de symptômes, suggèrent que les CL ne constituent pas une cause du dysfonctionnement neuronal, et

pourraient être au contraire une forme neuroprotectrice induite en réponse au stress neuronal (Parkkinen et al., 2005).

b) Les données de la littérature chez la souris

Comme décrit précédemment, de nombreux modèles de propagation de la pathologie α -syn, à partir d'injection de formes pathologiques d' α -syn, ont été développés au cours des dernières années. De manière intéressante, dans certains modèles on peut observer une corrélation entre les structures cérébrales affectées par la pathologie et les déficits comportementaux développés par les modèles, et dans d'autres non. Dans un modèle d'injection de fibrilles d' α -syn murine dans le Str de souris WT, les souris ont développé des troubles de la coordination motrice à 6 mois p.i. (Luk et al., 2012a). Cependant dans une étude similaire menée par Masuda-Suzukake, dans laquelle les fibrilles avaient été injectées dans la SN, aucun déficit moteur n'a été observé 6 mois p.i. (Masuda-Suzukake et al., 2013). La différence repose certainement dans le fait que le modèle de Luk et collaborateurs a subi une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN, ce qui n'est pas le cas dans le modèle de Masuda-Suzukake et collègues, alors que les mêmes fibrilles ont été injectées. Il semblerait donc que la seule différence entre ces études, et qui n'est pas des moindres, est le site d'injection, puisque les injections dans la SN ou dans le Str ont induit des patterns de propagation différents. Dans une troisième étude similaire, des injections bilatérales de fibrilles murines ont été réalisées dans le Str de souris WT, et malgré la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN, aucun déficit moteur n'a été observé 6 mois p.i. Des déficits dans une tâche de dominance sociale, dépendante du CPF, et dans une tâche de conditionnement de peur, dépendante de l'amygdale, ont cependant pu être observés, en accord avec la pathologie α -syn présentes dans ces structures cérébrales (Stoyka et al., 2019). Dans une autre étude, suite à l'injection ipsilatérale de fibrilles d' α -syn humaine recombinante dans le BO de souris WT, la pathologie s'est propagée dans le système olfactif et à d'autres régions interconnectées, et a induit des troubles olfactifs dès 1 mois p.i. (Rey et al., 2016). Il est intéressant de noter que dans ce modèle également on pouvait observer une dégénérescence des neurones des noyaux antérieurs olfactifs. Enfin, de manière étonnante, des injections bilatérales de fibrilles d' α -syn recombinante murine dans l'hippocampe de souris WT n'a pas induit de déficit de mémoire 3 mois p.i. malgré une pathologie hippocampique massive, mais encore une fois sans perte neuronale (Nouraei et al., 2018).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la NDG est nécessaire au développement des déficits dans ces modèles.

Il est donc possible que dans notre modèle, aucune aggravation du phénotype cognitif n'ait été observée car la pathologie n'est pas assez sévère. Il faudrait évaluer la neurodégénérescence et la neuroinflammation dans notre modèle. Nous pourrions évaluer la mort neuronale, soit en analysant la quantité de cellules apoptotiques par la technique TUNEL, soit en réalisant un dosage de la caspase-3 active, protéine de la cascade apoptotique. Cependant nous ne disposons que coupes des cerveaux des souris SNCA FIB. Dans ce cas il serait possible de réaliser un marquage neuronal grâce à l'anticorps NeuN et de réaliser une quantification volumétrique et/ou un comptage stéréologique dans les structures d'intérêt. Pour évaluer la neuroinflammation nous pourrions réaliser un immunomarquage GFAP (marqueur astrocytaire).

A l'heure actuelle il n'existe donc pas de consensus sur la corrélation directe entre la présence de pathologie Lewy et les signes neurologiques sous tendus par des structures cérébrales précises. Il semblerait que selon les individus chez l'Homme, et selon les individus et les conditions expérimentales chez la souris, on peut observer des corrélations entre les symptômes et la localisation et la sévérité de la pathologie α -syn, mais que d'autres facteurs interviennent sûrement dans l'induction de ces déficits.

IX. Discussion finale

Les modèles animaux de maladies neurodégénératives n'imitent jamais complètement la maladie humaine. Cependant les modèles sont généralement conçus selon l'idée qu'induire la protéinopathie peut récapituler les caractéristiques de la pathologie (Dawson et al., 2018). Les autopsies de patients atteints de maladies neurodégénératives ont permis d'observer et de décrire différentes protéinopathies en termes de localisation régionale mais aussi de densité. Dans le cas des synucléinopathies, il existe une gradation majeure en 6 stades de la pathologie Lewy dans la MP, décrite par Braak et collaborateurs (**Figure 58**) (Braak et al., 2003b). En 2002, Marui et collaborateurs ont publié une gradation en 4 stades pour la MCL, les critères se basant sur la pathologie Lewy présente dans l'amygdale, le cortex limbique et le néocortex (Marui et al., 2002). De manière intéressante, la pathologie au stade IV de Braak dans la MP est comparable aux stades I-IV pour la MCL en termes d'étendue (Yamamoto et al., 2005), mettant en exergue la différence d'étendue de la pathologie au début de la MCL par rapport à la MP. Mais si la propagation type prion de la pathologie Lewy à des structures interconnectées dans la MP explique le **caractère progressif** de la maladie avec une atteinte de plus en plus importante du cerveau, comment se fait-il que dans la MCL on observe une atteinte aussi étendue et diffuse dès les premiers stades de la pathologie ? Dans la MP, les stades de Braak suggèrent que la pathologie débute en périphérie soit dans le système olfactif, soit dans système nerveux entérique, puis se propage jusqu'au CNS dans le tronc cérébral. Existe-t-il un point unique de départ dans la MCL ? Se peut-il que ce soit le même que la MP mais que les voies de propagations suivies soient différentes ?

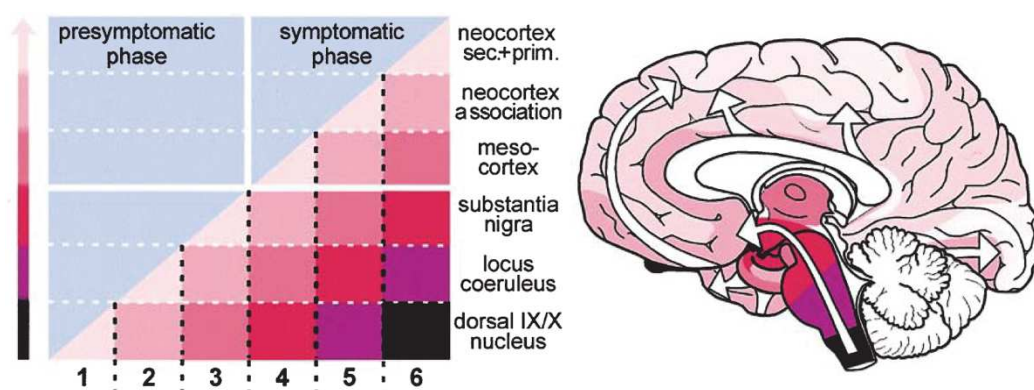


Figure 58. Progression de la pathologie Lewy dans la MP selon les 6 stades de Braak. (Braak et al., 2003).

Afin de modéliser ces pathologies chez l'animal, il existe différentes stratégies. On peut se baser sur les différences de structures affectées dans les différentes synucléinopathies

afin de les cibler et en espérant que la pathologie développée présente les caractéristiques de la maladie chez l'Homme, ou bien se baser sur les différences moléculaires des fibrilles pathologiques présentes dans les différences synucléinopathies.

A. Différences structurales

De nombreux modèles de synucléinopathies ont été générés en essayant d'induire la pathologie Lewy dans les structures décrites comme étant les plus affectées chez l'Homme. En se basant sur la topographie de la pathologie Lewy, cinq types ont été définis : « TC prédominant », « limbique » (transitionnel), « néocortical diffus » (McKeith et al., 1996, 2005), auxquels se sont rajoutés deux types supplémentaires, « BO uniquement » et « amygdale prédominant », qui selon McKeith ont de faibles chances de refléter une MCL (McKeith et al., 2017) (**Figure 59**). En effet, les types qui ont la plus forte probabilité d'être associés à une MCL sont les types « néocortical diffus » et « limbique ». En 2005, une étude menée sur 35 cas de patients MCL autopsiés suggère que dans les formes « TC prédominant », la pathologie progresse du TC vers le reste du cerveau, et correspond au développement du syndrome parkinsonien ; et que les formes « néocorticales » commencent dans le cortex, progressent vers le TC et sont liées au développement d'une ACM (Yamamoto et al., 2005).

Les modèles de synucléinopathies ont donc globalement été générés en essayant d'induire la pathologie Lewy dans les structures qui ont été décrites comme étant les plus affectées chez l'Homme.

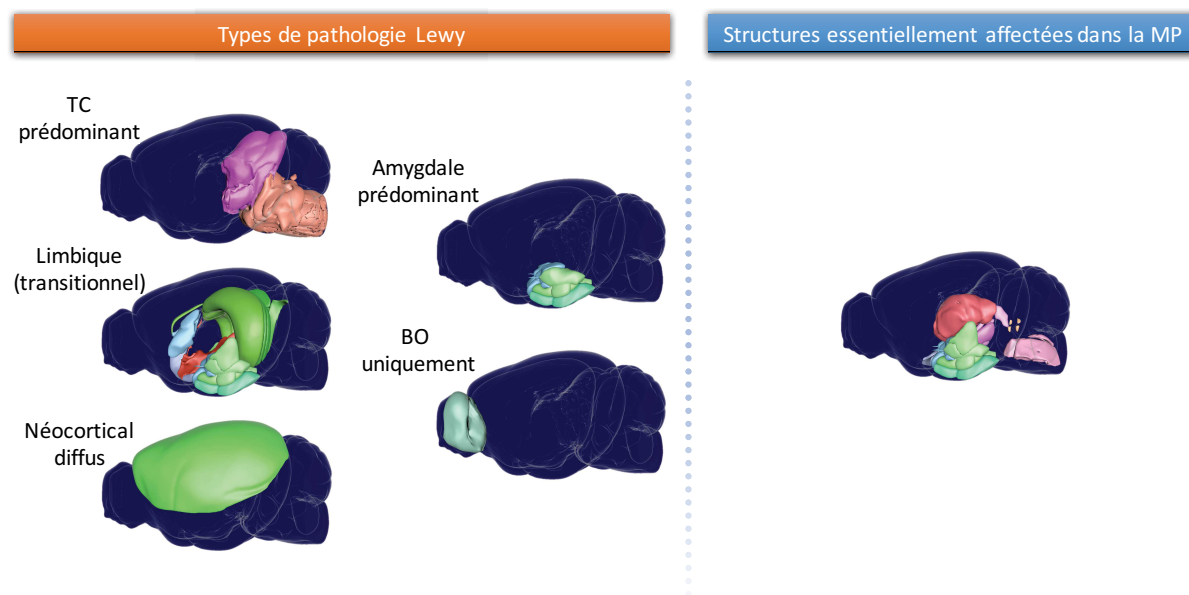


Figure 59. Représentation dans un cerveau de souris des structures affectées chez l'Homme dans les différents types de pathologie Lewy, et structures essentiellement affectées dans la MP. Les différents types de pathologie Lewy (McKeith et al., 1996, 2005, 2017). Les structures affectées dans la MP sont majoritairement dans le tronc cérébral (substance noire, noyaux moteur dorsal du nerf vague, noyau du Raphé, locus ceruleus + subceruleus, noyau réticulaire intermédiaire), ainsi qu'une partie du diencephale (thalamus), les noyaux amygdaloïdes, le noyau basal de Meynert, et le noyau réticulaire intermédiaire (Braak et al., 2003).

1. Expression diffuse de l' α -syn dans le cerveau

Durant ma thèse, afin de modéliser la MCL, nous avons choisi un modèle transgénique qui surexprime l' α -syn humaine de manière diffuse dans le cerveau en ciblant l'expression dans les neurones matures grâce au promoteur Thy-1. L'expression de l' α -syn humaine était en effet diffuse mais particulièrement importante dans l'hippocampe dorsal qui fait partie du système limbique, et également dans le cortex frontal. Les déficits que nous avons pu observer chez ces souris correspondent à ce qu'on peut observer chez des patients au stade précoce de la MCL, avec une atteinte du CF au niveau fonctionnel, sans atteinte majeure de l'HD, et sans atteinte motrice. Ceci est intéressant dans notre modèle, car la plupart des modèles de surexpression de l' α -syn entraînent des déficits moteurs importants et précoces, comme le modèle Thy1-h α -syn lignée 61 (Rockenstein et al., 2002 ; Fleming et al., 2004). Ce modèle présente des troubles cognitifs précoces mais également d'important troubles moteurs, et est donc considéré comme modèle de MP. L'expression de l' α -syn mutée (A30P) sous le promoteur Thy-1 peut également modéliser un phénotype de type MCL : déficits cognitifs en

piscine de Morris à 12 mois, en conditionnement de peur à 16-19 mois, associés à une pathologie α -syn pS129 étendue du TC aux bulbes olfactifs, en passant par l'hippocampe et l'amygdale (Kahle et al., 2000 ; Neumann et al., 2002 ; Freichel et al., 2007 ; Schell et al., 2009). Dans d'autres cas l'expression diffuse grâce au promoteur Thy-1 peut aussi atteindre la moelle épinière et entraîner une atteinte des motoneurones, et dans ce cas les déficits moteurs observés ne sont pas représentatifs de la MP (van der Putten et al., 2000). En effet, l'expression du transgène sous le promoteur Thy-1 peut induire différents patterns d'expression et de densité de pathologie également (Hatami et Chesselet, 2015).

Globalement, l'expression dans les neurones matures de l' α -syn sous le promoteur Thy-1 est un outil intéressant pour étudier les déficits liés à la pathologie α -syn diffuse corticale ou limbique présente dans certains modèles, et donc pour l'étude de la MCL (Hatami et Chesselet, 2015). De manière intéressante, l'expression de l' α -syn murine sous le promoteur Thy-1 n'induit pas de déficits cognitifs (Rieker et al., 2011).

2. Expression ciblée de l' α -syn dans le tronc cérébral

Le tronc cérébral a été largement ciblé par différentes études afin de modéliser la maladie de Parkinson, notamment en ciblant la SN ou encore le système entérique et le noyau dorsal moteur du nerf vague. La SN peut aussi être affectée dans la MCL, et il faut d'ailleurs évaluer la présence ou l'absence de mort neuronale dans la SN dans les critères neuropathologiques de la MCL (McKeith et al., 2017).

a) Substance noire et striatum

Etant donné que l'atteinte vraiment caractéristique de la MP, et qui est à l'origine des déficits moteurs, est la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc, cette région en fait une cible idéale pour la génération de modèles. Du fait des projections dopaminergiques que cette structure envoie dans le Str, celui-ci peut également être ciblé. Afin de cibler ces structures, il est possible d'exprimer un transgène sous le promoteur TH, de réaliser des transfections virales d' α -syn dans ces structures, mais aussi de réaliser des injections stéréotaxiques de fibrilles d' α -syn préformées.

Les modèles qui expriment l' α -syn sous le promoteur TH présentent différents degrés de pathologie nigrostriatale mais aucun déficit cognitif n'a été reporté dans ces modèles

murins (Chesselet et Richter, 2011). L'expression ciblée de l' α -syn A53T dans la SN et l'aire tegmentale ventrale grâce au promoteur PITX3 induit une pathologie motrice importante mais là non plus aucun déficit cognitif n'a été reporté. Les modèles transgéniques SNCA pour la MP (SNCA muté ou WT, sous les promoteurs Thy-1, prion, PDGF β ou TH) ne récapitulent pas la caractéristique clé de la MP, c'est à dire la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN (Chesselet et Richter, 2011). Cependant, les modèles d'injections de fibrilles d' α -syn recombinante dans la SN ou le Str sont plus efficaces et provoquent la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN ainsi que des troubles moteurs (Luk et al., 2012a ; Recasens et al., 2014). De manière intéressante, un autre modèle d'injection de fibrilles d' α -syn recombinante dans le Str induit une pathologie α -syn pS129 diffuse dans le Cx (dont le CF, somatosensoriel, moteur, insulaire, PRh et Ent) et dans l'amygdale, une perte neuronale dans la SNc, et des déficits cognitifs (dominance sociale associée au cortex préfrontal, et conditionnement de peur associé à l'amygdale), sans présenter de déficits moteurs (Stoyka et al., 2019). Ce modèle est intéressant car la neuropathologie se rapproche de celle de la MCL, et l'atteinte frontale correspond également à la pathologie humaine.

b) Systeme entérique et noyau moteur dorsal du nerf vague

Des fibrilles d' α -syn recombinantes ont été injectées dans les couches musculaires fortement innervées par le nerf vague, du pylore et du duodénum de souris WT, de souris SNCA KO et de souris WT ayant subi une vagotomie (section du nerf vague) (**Figure 60**) (Kim et al., 2019). Un mois après l'injection on peut déjà observer un marquage α -syn pS129 dans le TC des souris WT fibrilles uniquement. Il y a donc une propagation de la pathologie via le nerf vague, mais pas si la souris n'exprime pas du tout d' α -syn, favorisant respectivement les hypothèses de propagation et de transmission de la pathogénicité à la manière de protéines PrP (« prion-like »). A 3 mois p.i. la pathologie a progressé jusqu'à l'amygdale et commence à s'accumuler dans la SNc, et peut être observée dans l'hypothalamus et le cortex préfrontal. A 7 mois p.i., la pathologie s'est répandue au Str et à l'hippocampe, et commence à apparaître dans le BO. A ce stade, on peut observer une perte neuronale dans la SNc qui est la caractéristique clé de la MP, associée à des déficits moteurs. On observe également des déficits d'apprentissage spatial et de mémoire à long terme récente (24h) en piscine de Morris chez les souris injectées, ainsi qu'en RNO à un délai de 24h, en conditionnement de peur, et en mémoire de travail. Ces déficits sont associés à une augmentation de la pathologie α -syn

pS129 et à une réduction du taux de NeuN dans l'hippocampe. De plus on observe également des troubles du comportement dit « psychologique » (phénotype anxieux et de type dépressif, réduction de la construction du nid, diminution de l'activité locomotrice, déficit de détection d'odeur). Cette étude conforte l'hypothèse de l'origine entérique de la MP, ainsi que la progression de la MP vers la DP avec le développement de pathologie Lewy corticale.

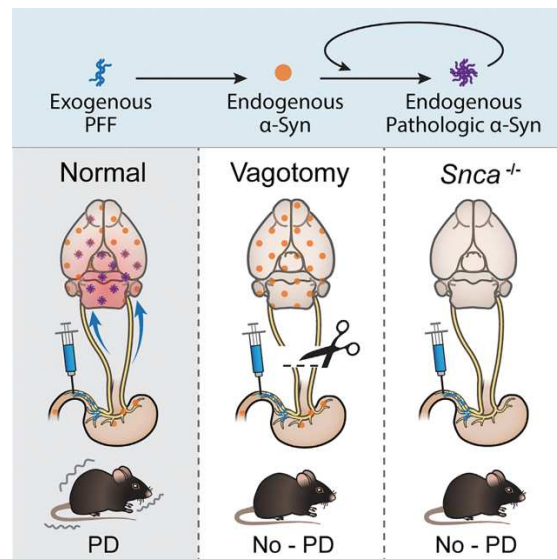


Figure 60. Résultats majeurs de l'injection de fibrilles d' α -syn dans les couches musculaires du pylore et du duodénum innervés par le nerf vague. Seules les souris qui présentent un nerf vague intact et une expression normale d' α -syn endogène développent un phénotype type Parkinson. Kim et al., 2019.

3. Expression ciblée de l' α -syn dans les BO

L'injection de fibrilles d' α -syn recombinante dans le BO de souris WT a entraîné une propagation progressive de la pathologie α -syn aux structures interconnectées et diffuse grâce à la propagation transynaptique (Rey et al., 2016, 2018). En effet au bout de 12 mois p.i. on peut observer la pathologie dans plus de 40 régions et sous régions cérébrales (CF, Str, CI, hippocampe dorsal et ventral, amygdale, PRh, Ent). Cette pathologie est associée à des déficits olfactifs sévères et une perte neuronale dans les noyaux antérieurs olfactifs 6 mois p.i. Il serait intéressant d'évaluer le phénotype moteur et cognitif de ces souris, qui pourraient présenter des troubles cognitifs liés à l'implication des structures limbiques et frontales. Cependant, il est intéressant de noter qu'il n'y a pas d'atteinte majeure de la SN, ni du noyau moteur dorsal du nerf vague. La caractérisation comportementale permettrait de déterminer s'il s'agit plutôt

d'un modèle type MCL ou type MP. Pour l'instant ce modèle est considéré comme un modèle prodromal de MP en raison des déficits olfactifs observés et du pattern de propagation, mais chez les patients MCL on observe également une atteinte précoce du système olfactif. Ce type de modèle, très consistant avec l'anatomopathologie de la synucléinopathie diffuse retrouvée dans la MCL, mais dont la caractérisation phénotypique comportementale manque encore, pourrait soutenir une origine différente de la MCL, à savoir, par les bulbes olfactifs.

4. Expression ciblée de l' α -syn dans l'insula

Alors que la clinique apporte des preuves de la sensibilité de l'insula antérieure chez les patients MCL au stade précoce (Blanc et al., 2014, 2015, 2016 ; Roquet et al., 2017), nous avons voulu tester chez la souris, si l'injection de fibrilles dans cette structure pouvait conduire à la diffusion de la synucléinopathie dans le cerveau, notamment aux zones touchées dans la MCL. Les injections de fibrilles h α -syn que nous avons réalisées dans le CI ant de souris SNCA ou WT ont révélé une propagation importante et diffuse aux structures interconnectées, l'hippocampe demeurant relativement épargné. En effet, dans notre étude nous avons majoritairement observé une pathologie α -syn pS129 dans le Str, l'amygdale et le thalamus ainsi que de manière diffuse dans le CI, le CPF, le PRh, et l'Ent. Cette propagation est intéressante car elle touche des structures néocorticales, ainsi que limbique comme dans la MCL chez l'Homme. Les souris SNCA qui étaient injectées bilatéralement n'ont pas présenté de déficits moteurs par rapport aux SNCA PBS à 7-9 mois p.i., ce qui pourrait être lié à un effet de compensation dû à la surexpression d' α -syn humaine dans les neurones depuis leur développement post-mitotiques. Les souris WT fibrilles quant à elles ont été injectées unilatéralement et leur caractérisation comportementale est actuellement en cours.

Il est intéressant de noter que dans le modèle de Stoyka décrit plus haut, l'injection d' α -syn murine recombinante entraîne également une pathologie étendue et notamment dans le CI, le CF et l'amygdale (Stoyka et al., 2019). Ce modèle présentant une pathologie importante, il est possible que l'injection de fibrilles dans le CI ant de souris WT induise un phénotype cognitif similaire. Étonnamment, le pattern de propagation observé avec l'injection des fibrilles dans le BO ressemble moins à ce que nous avons observé avec nos injections dans le CI ant, alors que le CI ant est connecté aux régions olfactives antérieures. En effet, ce modèle ne présente pas d'atteinte des cortex somatosensoriel et moteur avant 12

mois p.i., et même à ce stade elle demeure ipsilatérale. De plus la pathologie présente dans le Str et dans le thalamus 12 mois p.i. est assez faible (Rey et al., 2016, 2018).

Les informations présentes dans la littérature récente mettent en avant l'implication du CI dans la MCL. D'une part, la pathologie Lewy a pu être observée dans le CI de patients à des stades avancés de la MCL. Ce qui est intéressant c'est à des stades précoces de la pathologie, on peut observer une atrophie du CI antérieur. Une étude récente a montré une corrélation directe entre l'accumulation de l' α -syn et la mort neuronale. En effet, grâce à de l'imagerie *in vivo*, Osterberg et collaborateurs ont pu observer une dégénérescence sélective des neurones contenant des inclusions (Osterberg et al., 2015). Ceci suggère que dans la MP la dégénérescence des neurones DA de la SN est directement liée à l'accumulation importante d' α -syn pathologique. Il est donc possible que dans la MCL, l'insula soit une des premières structures à dégénérer en raison de l'accumulation d'agrégats. De ce fait notre modèle d'injection de fibrilles dans le CI ant pourrait être un bon modèle, au moins pour la propagation de la pathologie dans la MCL. De plus, l'insula est un centre d'intégration très important, hyperconnecté, qui permettrait une propagation diffuse assez rapide à l'ensemble du cortex et des structures subcorticales, via les nombreuses voies neuronales. Ceci permettrait notamment d'expliquer pour la MCL présente une pathologie Lewy étendue dès les premiers stades de la maladie, contrairement à la MP.

B. Différences moléculaires des fibrilles pathologiques

A l'heure actuelle, on ne sait toujours pas comment une même protéine pathologique peut cibler différentes populations cellulaires, propager via des voies différentes et à des vitesses différentes pour finalement induire des synucléinopathies aux caractéristiques cliniques distinctes (Rey et al., 2019). Cependant, on sait maintenant que la pathologie Lewy est capable de se propager de manière prion. Une des propriétés les plus intéressantes des prions, est leur capacité à former des agrégats de conformations distinctes, qui donnent des profils de lésions histopathologiques distincts, avec des distributions dans les régions cérébrales qui sont différentes, et des manifestations cliniques différentes (Bousset et al., 2013 ; Dur et al., 2017 ; Peng et al., 2018). Il est possible que l' α -syn possède les mêmes

capacités que la protéine prion puisque l'on sait déjà qu'il peut y avoir différentes souches pathologiques d' α -syn (Bousset et al., 2013 ; Guo et al., 2013).

Les différentes souches sont en fait des variants conformationnels de l' α -syn sous sa forme pathologique. Les deux polymorphes les plus étudiés *in vitro* et *in vivo* sont les fibrilles et les « ribbons » (Bousset et al., 2013 ; Peelaerts et al., 2015 ; Rey et al., 2019) qui présentent des caractéristiques différentes en termes de structure, d'efficacité de nucléation et de propagation (plus ou moins rapide), mais également de **tropisme et de toxicité cellulaire**. Comme les différentes souches ont des surfaces différentes, l'induction de la neuroinflammation n'est peut-être pas la même selon les souches, ce qui pourrait avoir un effet sur le taux de neurodégénérescence. De même, il est possible que la clairance des différentes souches ne se fasse pas avec la même efficacité (Melki, 2015). De plus, *in vitro* les deux variants ont la capacité de transmettre leur pathogénicité à l' α -syn soluble tout en lui imprimant leur structure intrinsèque (Bousset et al., 2013), comme c'est le cas des protéines prions scrapies. Chez le rongeur, on sait que différentes souches d' α -syn peuvent en effet induire une pathologie différente, soit en injectant des souches recombinantes d' α -syn pathologique (Peelaerts et al., 2015 ; Rey et al., 2019), soit en injectant des extraits d'homogénats de cerveaux de patients atteints d'AMS ou de MP dans le cerveau de souris (Watts et al., 2013 ; Recasens et al., 2014). Ces souris ont développé des phénotypes neuropathologiques et comportementaux semblables à ceux de l'AMS et de la MP respectivement.

Afin de se rapprocher de l'Homme et de voir si la transmission de la pathogénicité et la propagation se produisaient également dans des neurones humains, une étude a étudié cela dans un réseau neuronal cortical humain reconstruit en culture cellulaire dans une chambre microfluidique (Gribaudo et al., 2019). L'utilisation d'une chambre microfluidique permet de contrôler le milieu de chaque chambre, et dans chacune des chambres des neurones humains ont été différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC). Des connexions neuronales se forment entre les neurones des deux chambres via les petits « tunnels » qui les relient. A partir de là, l'une ou l'autre de deux différentes souches de formes pathologiques d' α -syn (fibrilles ou « ribbons ») ont été placées dans la chambre proximale. Dans la chambre proximale, les chercheurs ont pu observer une transmission de la pathologie et une amplification à partir de l' α -syn, et ont également pu observer la propagation de la pathologie dans les neurones interconnectés de la chambre

distale, où la pathologie s'est également développée (**Figure 61**). La pathologie est positive pour l' α -syn pS129, pour p62 et pour l'ubiquitine, suggérant qu'il s'agit bien d'une pathologie de type Lewy. De plus, l'accumulation de la pathologie est corrélée à une altération de l'activité neuronale et un dysfonctionnement mitochondrial. Cette étude met donc en évidence **une induction sporadique de la pathologie au niveau humain**, avec une efficacité plus importante de la part des « ribbons » que des fibrilles, comme cela avait déjà été montré chez la souris (Peelaerts et al., 2015 ; Peng et al., 2018), bien que l'inverse ait été observé *in vitro* (Bousset et al., 2013). Il reste maintenant à caractériser les différentes souches humaines d' α -syn qui induisent les différentes synucléinopathies.

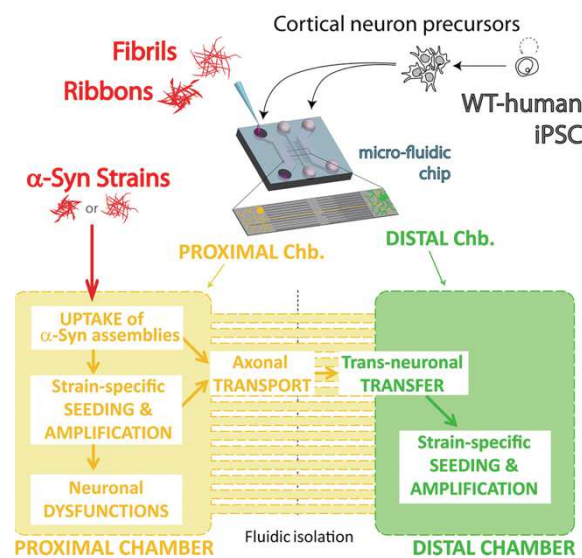


Figure 61. Présentation du dispositif utilisé dans l'étude de transmission et de propagation de différentes souches pathologiques d' α -syn. Gribaudo et al., 2019.

Il est suggéré que le MCL débute également dans le TC et qu'à partir de là il y a propagation à l'ensemble du néocortex (Peng et al., 2018). Comme il a été montré que la vitesse de propagation de différentes souches pathologiques d' α -syn est différente (Bousset et al., 2013), se pourrait-il que la différence de pathologie diffuse néocorticale au stade précoce de la MCL, en comparaison à la propagation progressive de la pathologie dans la MP qui n'atteint le néocortex qu'au stade avancé, soit liée à la cinétique de différentes souches d' α -syn ? Ainsi même en partant du TC, du fait du tropisme et de l'efficacité d'une souche différente d' α -syn dans la MCL, la pathologie Lewy atteindrait plus rapidement l'ensemble du

cerveau dans la MCL que dans la MP. Le tropisme cellulaire expliquerait quant à lui les différents localisation régionale de la pathologie Lewy entre les différentes synucléinopathies.

Pour finir, afin qu'un modèle récapitule l'ensemble des caractéristiques d'une maladie neurodégénérative, il est plus probable que différents facteurs doivent intervenir. C'est pourquoi il est plus intéressant de combiner les approches. Par exemple, il a été démontré chez l'Homme qu'il existe une synergie entre l'A β et l' α -syn dans les cas de copathologie MA/MCL (Ferman et al., 2004 ; Irwin et al., 2013). De manière intéressante, le modèle double transgénique A β / α -syn généré par Masliah et collaborateurs modélise une pathologie type MCL (Masliah et al., 2001 ; Mandler et al., 2019). Il est également possible de combiner l'expression du gène SNCA avec un facteur de risque comme l'APOE4 ou le GBA. Il a été observé que dans un modèle murin α -syn A53T, l'haploinsuffisance en GBA accélère la pathologie α -syn (Ikuno et al., 2019). D'autre part, un modèle double transgénique APOE4/SNCA généré au laboratoire à partir du modèle SNCA, a permis d'observer une aggravation du phénotype comportemental du modèle SNCA, avec une modification de l'activité locomotrice (hyperactivité diurne), ainsi qu'une altération importante des capacités de nesting à 12-14 mois (travail en cours).

X. Conclusion & perspectives

Lors de ma thèse, j'ai phénotypé le modèle SNCA qui surexprime l' α -syn majoritairement dans le CF et l'HD, et qui n'avait jamais été étudié auparavant. La caractérisation comportementale a permis de mettre en évidence un déficit essentiellement frontal à 12-14 mois, ainsi qu'une possible atteinte des Cx périrhinal et entorhinal latéral. La fonction de l'HD semble quant à elle préservée à cet âge. La caractérisation anatomopathologique à 14 mois a permis de mettre en évidence une pathologie α -syn pS129 importante dans le CF et l'HD. De manière intéressante, les souris SNCA présentent une diminution des marqueurs synaptiques synaptophysine I et PSD95, et du marqueur axonal Rab1, ainsi qu'une tendance à la baisse du marqueur neuronal nucléaire NeuN et du marqueur astrocytaire GFAP, et cela uniquement dans le CF. Il est également important de noter que les souris SNCA ne présentent pas de déficit moteur majeur à l'âge de 18 mois. Les souris SNCA présentent donc des déficits frontaux à la fois au niveau neuropathologique et comportemental. Nous avons pu corrélérer les déficits frontaux comportementaux à ceux observés chez les patients aux stades prodromaux de la MCL de l'étude AlphaLewyMA, suggérant que notre modèle pourrait être utilisé en préclinique pour l'étude de MCL prodromale. Cependant, la caractérisation anatomopathologique peut être précisée en incluant des caractéristiques spécifiques de la pathologie Lewy, à savoir un comarquage de l' α -syn pS129 avec p62 qui cible les protéines pour l'autophagie, ou bien un marquage Thioflavine S qui se lie spécifiquement aux feuillets β . Ceci permettrait de savoir s'il y a un changement de conformation de l' α -syn en plus de la modification post-traductionnelle pS129. De plus, il serait également intéressant de réaliser d'autres tests comportementaux, comme par exemple un test permettant d'évaluer les capacités attentionnelles des souris SNCA, puisque les fluctuations attentionnelles constituent une caractéristique essentielle de la MCL chez l'Homme. Un article est actuellement en cours de rédaction sur cette première partie de ma thèse, et ce travail a été présenté lors de communications orales et posters (**Annexe 5**).

Dans une deuxième partie de ma thèse, nous avons voulu étudier l'effet de l'injection bilatérale de fibrilles d' α -syn pathologiques dans le CI ant des souris SNCA. En effet, cette structure a été décrite comme étant une des premières régions altérées fonctionnellement et structurellement (diminution de son volume) dans la MCL chez l'Homme (Blanc et al., 2014, 2015, 2016 ; Roquet et al., 2017). L'injection de fibrilles d' α -syn n'a pas induit d'amplification

du phénotype cognitif des souris SNCA à 12-14 mois, soit 7-9 mois p.i. Cependant, nous avons pu observer une propagation diffuse de la pathologie α -syn pS129 au sein de l'insula, dans les structures corticales somatosensorielles et motrices, ainsi que dans les structures subcorticales telles que l'amygdale, le Str ventral et le thalamus qui sont les régions majoritairement connectées au CI ant (Gehrlach et al., 2020), suggérant une propagation via les connexions neuronales. Il est possible que nous n'ayons pas observé d'aggravation du phénotype cognitif parce que 1/ nous n'avons pas utilisé les tâches comportementales adéquates pour observer une atteinte du Str ventral (noyau accumbens) et de l'amygdale ; 2/ les souris SNCA sont capables de compenser soit au niveau des mécanismes de dégradation protéique, soit au niveau fonctionnel en compensant le déficit par l'implication d'autres structures cérébrales. Il aurait donc été plus intéressant de réaliser des tests comportementaux différents, tels qu'un test de dépendance au sucrose pour tester la fonction du noyau accumbens, ou un test de conditionnement de peur afin d'évaluer les fonctions amygdaliennes. Nous avons réalisé des injections bilatérales dans le CI ant de souris WT afin de tester la deuxième hypothèse. Ainsi, le phénotypage comportemental des souris WT fibrilles nous permettra de savoir si la propagation de la pathologie α -syn dans des structures interconnectées peut induire des déficits fonctionnels. Dans le cadre de la même étude, nous avons réalisé des injections unilatérales de fibrilles d'h α -syn dans le CI ant de souris WT afin d'observer la propagation de la pathologie α -syn. De cette manière, nous avons pu identifier une propagation importante controlatérale, et surtout dans le CI ant. Les structures affectées semblent être les mêmes que dans le modèle SNCA fibrilles.

Ainsi, si la propagation diffuse de la pathologie au sein du néocortex et des structures limbiques du modèle WT fibrilles induit des troubles cognitifs associés à ces atteintes structurelles, le modèle WT fibrilles pourrait être un modèle intéressant pour l'étude de la MCL.

XI. Figures supplémentaires

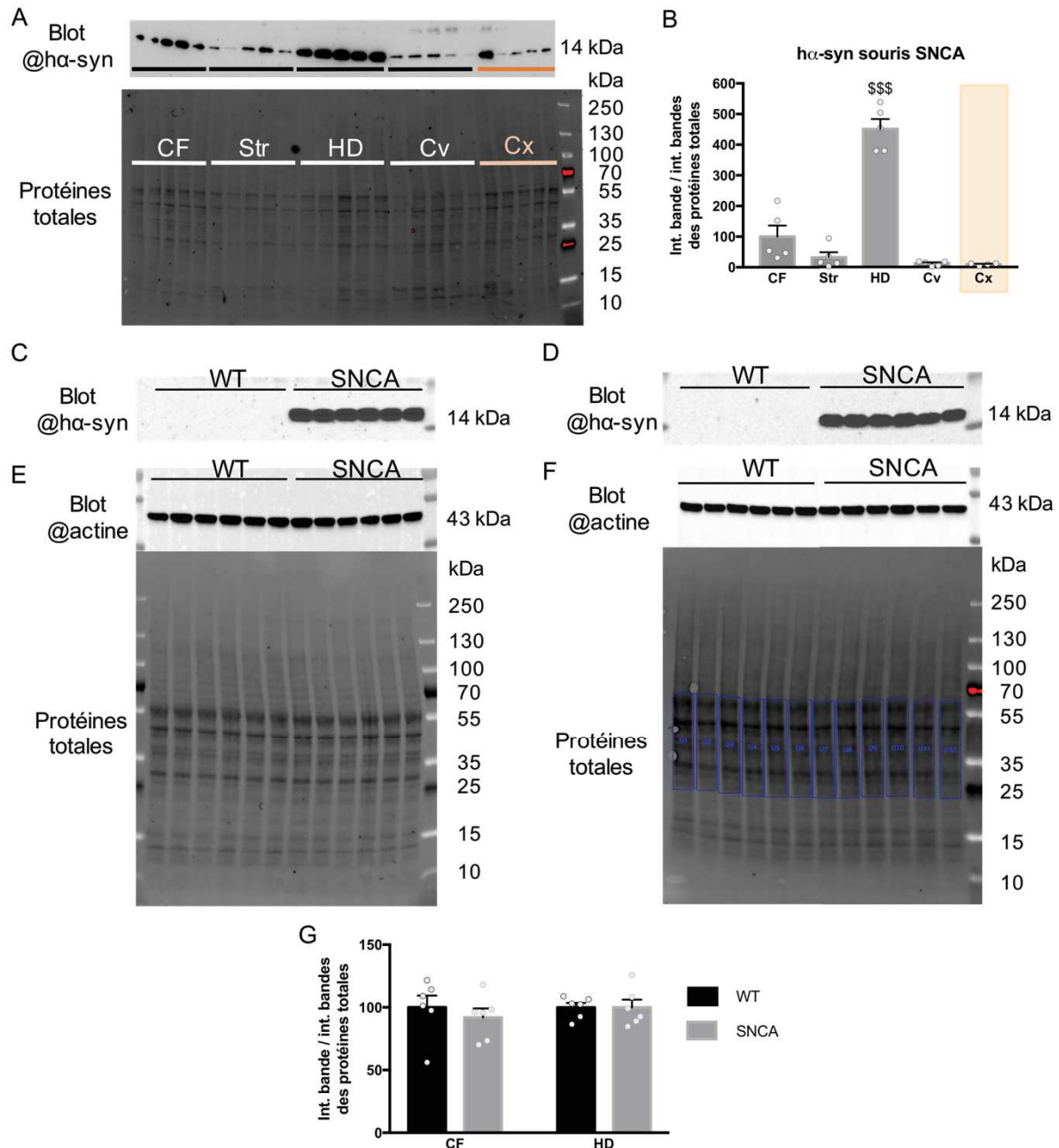


Figure S1. Western blots et protéines totales pour l' α -syn et l'actine. (A) Western blot représentatif de l' α -syn dans le CF, le Str, l'HD, le Cv et le Cx de souris SNCA âgées de 14 mois et membrane présentant les protéines totales permettant la normalisation du taux protéique de l' α -syn ($n = 5$ / structure, sauf Cx $n = 4$). (B) Quantification du Western blot représenté en (A) (ANOVA à un facteur : $F_{(4,19)} = 63,1$, $p < 0,001$; Test de comparaisons multiples de Tukey : CF vs Str $p = 0,281$, CF vs HD $p < 0,001$, CF vs Cv $p = 0,099$, CF vs Cx $p = 0,113$, Str vs HD $p < 0,001$, Str vs Cv $p = 0,972$, Str vs Cx $p = 0,964$, HD vs Cv $p < 0,001$, HD vs Cx $p < 0,001$, Cv vs Cx $p > 0,999$). L'intensité des bandes a été corrigée par rapport aux bandes des protéines totales du blot. (C, D) Western blots représentatifs de l' α -syn dans le CF (C) et l'HD (D) des souris SNCA comparé aux souris WT âgées de 6 mois. (E, F) Western blots représentatifs de l'actine et membranes montrant les protéines totales dans le CF (E) et l'HD (F) des souris SNCA comparé aux souris WT âgées de 6 mois. (G) Quantifications des Western blots représentés en (E) et (F) (Test t de Student : CF $p = 0,515$, HD $p = 0,997$). L'intensité des bandes a été corrigée par rapport aux bandes des protéines totales du blot. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; \$\$\$ $p < 0,001$ par rapport aux autres structures. CF, cortex frontal ; Str, striatum ; HD, hippocampe dorsal ; Cv, cervelet ; Cx, cortex.

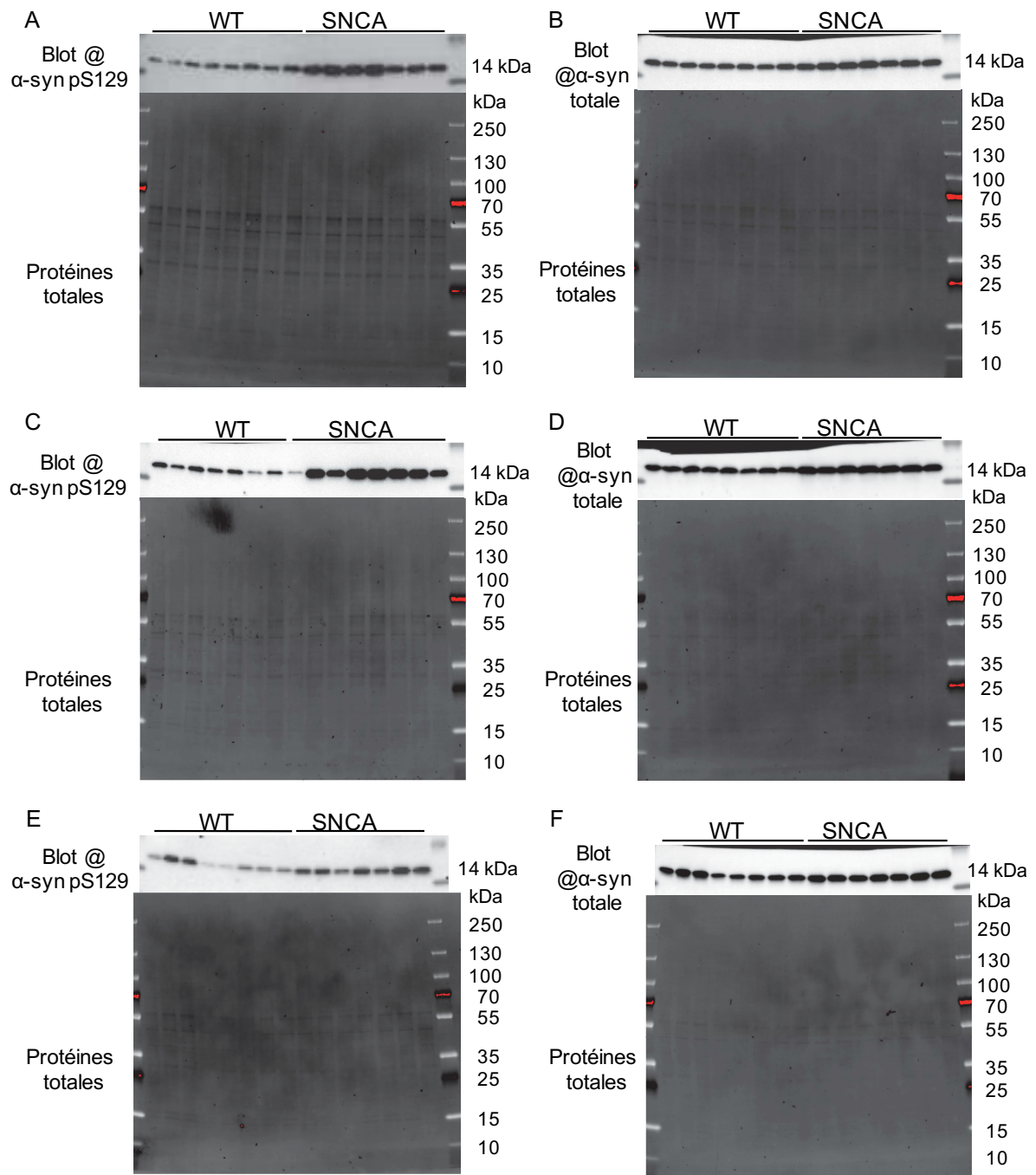


Figure S2. Western blots et protéines totales pour la quantification des taux d'α-syn pS129 et totale. (A,C,E) Western blots représentatifs et membranes présentant les protéines totales permettant la normalisation du taux protéique de l'α-syn pS129 dans (A) le CF, (C) l'HD, et (E) le Str des souris SNCA âgées de 14 mois. (B,D,F) Western blots représentatifs et membranes présentant les protéines totales permettant la quantification du taux protéique de l'α-syn totale dans (B) le CF, (D) l'HD et (F) le Str des souris SNCA âgées de 14 mois. CF, cortex frontal ; Str, striatum ; HD, hippocampe dorsal ; Cx, cortex.

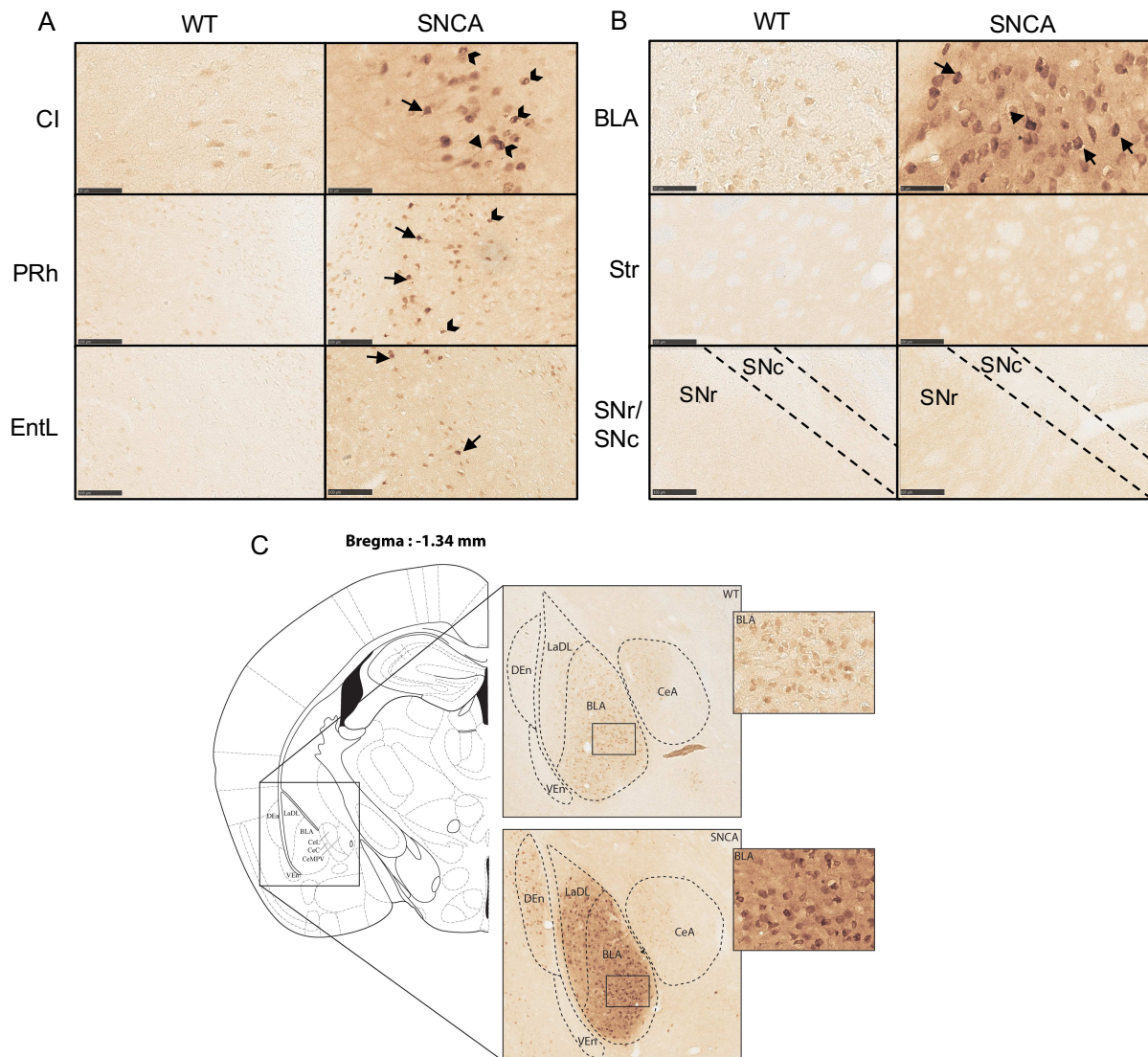
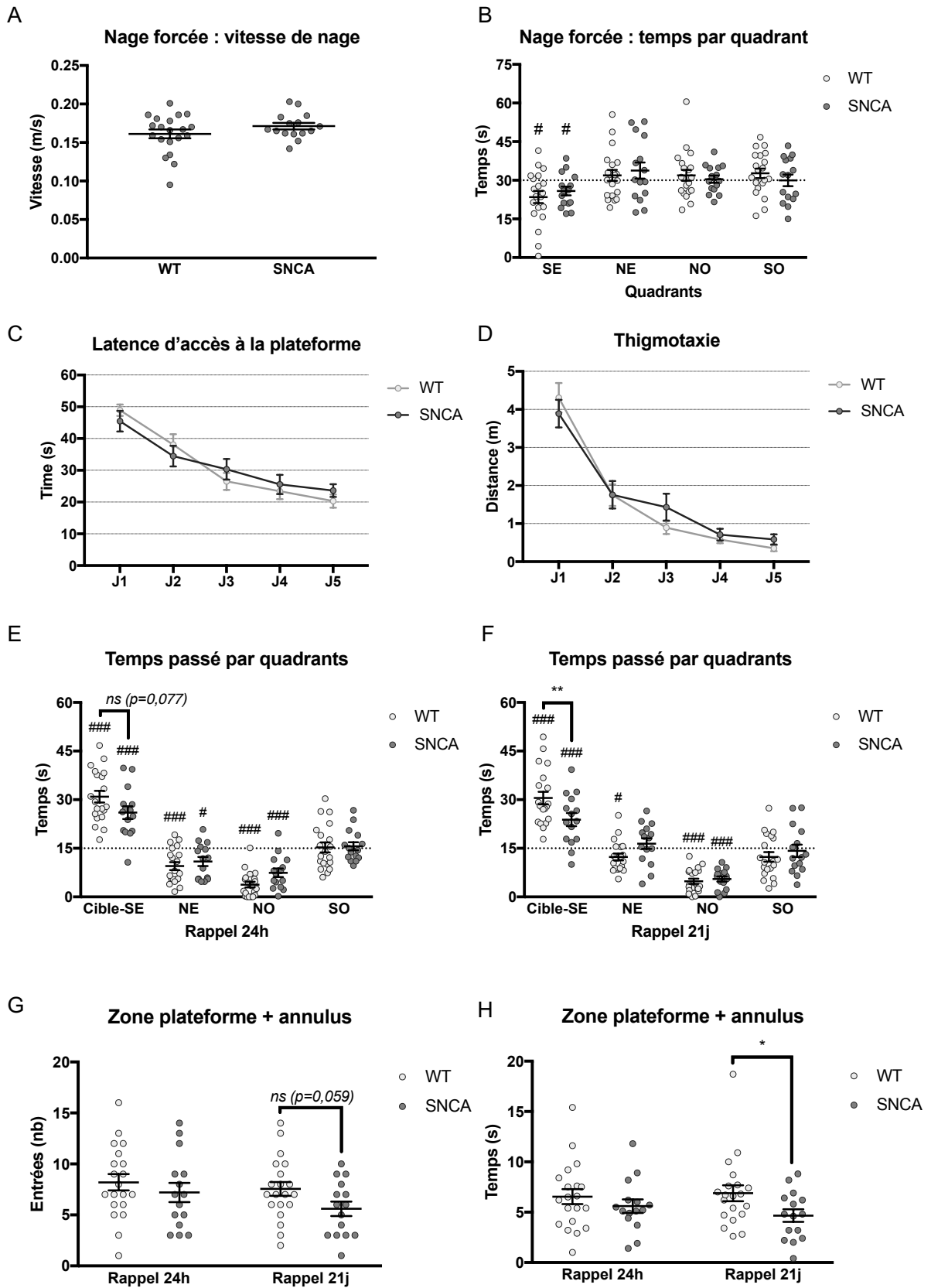


Figure S3. Immunohistochimie α -syn pS129 réalisée sur des coupes frontales de cerveau de souris WT et SNCA âgées de 14 mois. Marquages somatiques homogènes (**flèches**) ou de type fibrillaire (**chevrons**), et des marquages de type neurite (**têtes de flèche**) dans (A) des structures corticales (B) subcorticales. (C) Marquage α -syn pS129 dans la BLA et la LaDL des souris SNCA comparé aux souris WT. Echelle = 50 μ m (CI, BLA) ou 100 μ m (PRh, EntL, Str, SNr/SNc). BLA, amygdale basolatérale ; CeA, amygdale centrale ; CI, cortex insulaire ; DEn, claustrum endopiriforme dorsal ; EntL, cortex entorhinal latéral ; LaDL, amygdale latérale partie dorsolatérale ; PRh, cortex périrhinal ; SNr, substance noire réticulée ; SNc, substance noire compacte ; Str, striatum ; Ven, claustrum endopiriforme ventral.



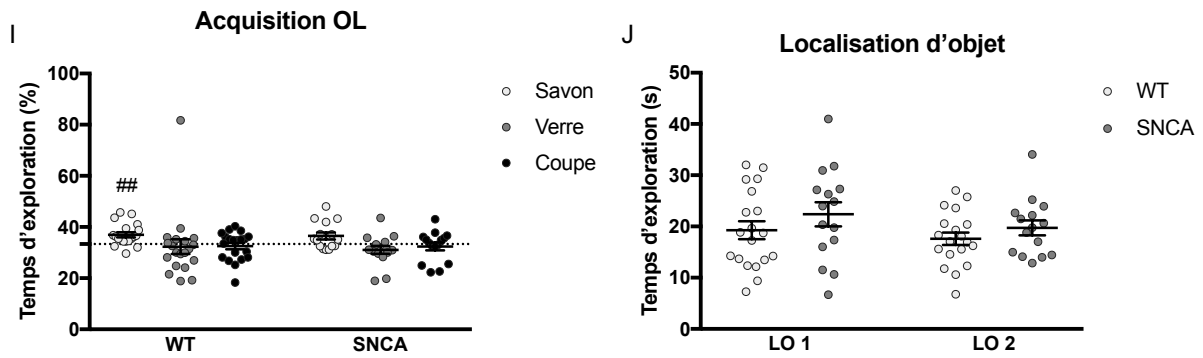
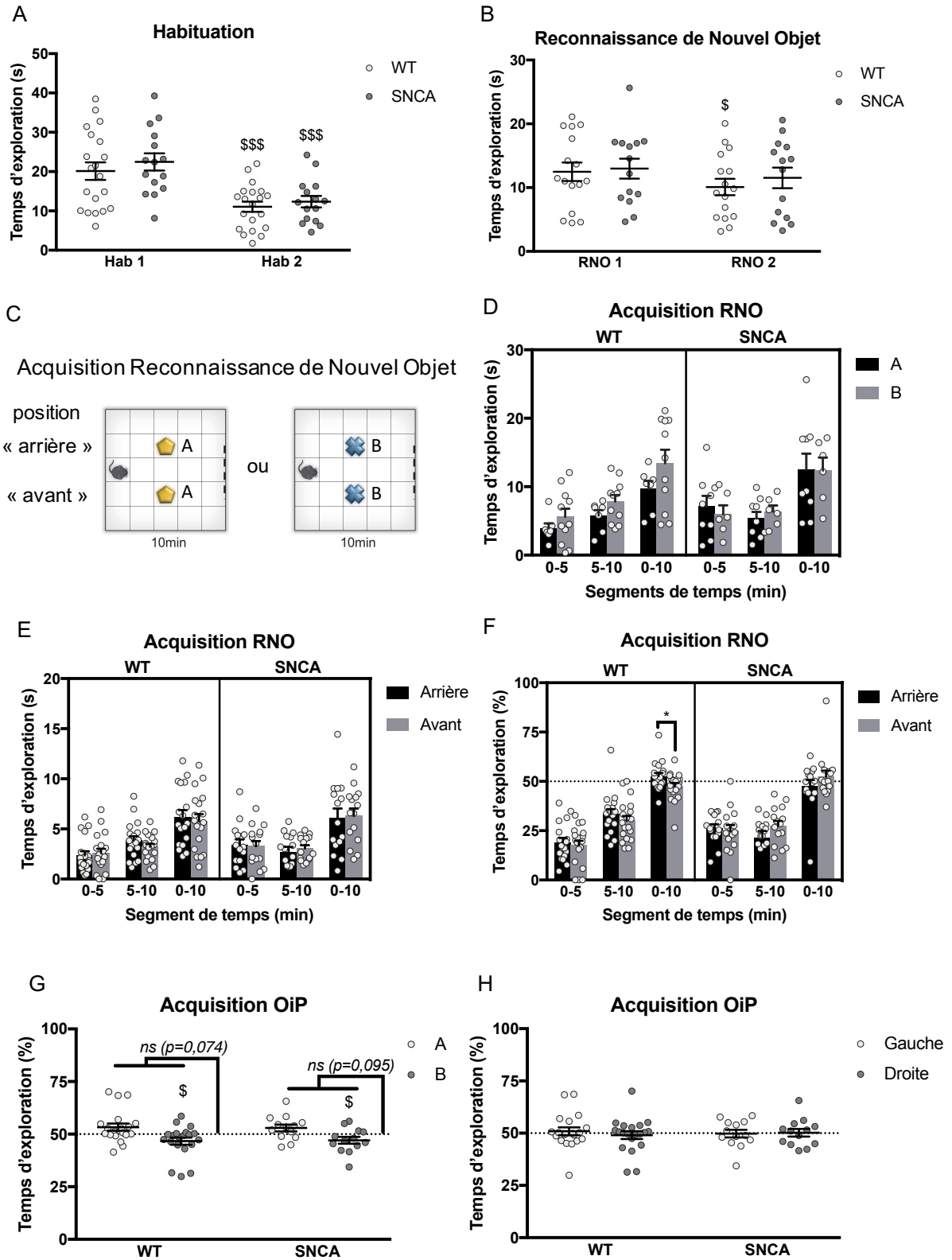


Figure S4. La mémoire spatiale en piscine de Morris et dans la tâche de localisation d'objets chez des souris SNCA âgées de 12-14 mois. (A) Vitesse de nage lors de la nage forcée. **(B)** Temps moyen passé par quadrant lors de la nage forcée et comparaison au hasard (30s) (ANOVA à deux facteurs : effet quadrant $F_{(3,132)} = 5,54$, $p = 0,001$; Test t de comparaison de moyenne à un standard (30) : **WT**, SE $p = 0,012$, $p < 0,05$, NE $p = 0,380$, SO $p = 0,163$, **SNCA**, SE $p = 0,027$, $p < 0,05$, NE $p = 0,243$, NO $p = 0,758$, SO $p = 0,984$; Test des rangs signés de Wilcoxon de comparaison d'une médiane à un standard (30) : WT NO $p = 0,552$). **(C)** Latence moyenne d'accès à la plateforme lors de l'acquisition d'une mémoire spatiale (ANOVA à mesures répétées : effet jours $F_{(4,132)} = 31,8$, $p < 0,001$). **(D)** Distance parcourue en zone de thigmotaxie lors des 5 jours d'apprentissage (ANOVA à mesures répétées : effet jours $F_{(4,132)} = 79,8$, $p < 0,001$). **(E,F)** Temps moyen passé par quadrant lors du rappel **(E)** 24h (ANOVA à deux facteurs : effet quadrants $F_{(3,132)} = 89,31$, $p < 0,001$; Test de comparaisons multiples de Sidak : WT vs SNCA, quadrant SE $p = 0,077$; Test de comparaisons multiples de Tukey : SE vs NE, NO ou SO $p < 0,001$ pour WT et SNCA ; Test t de comparaison d'une moyenne à un standard (15) : **WT**, SE et NE $p < 0,001$, SO $p = 0,857$, **SNCA**, SE et NO $p < 0,001$, NE $p = 0,012$, $p < 0,05$, SO $p = 0,630$; Test des rangs signés de Wilcoxon de comparaison d'une médiane à un standard (15) : WT NW $p < 0,001$) et **(F)** 21j (ANOVA à deux facteurs : effet quadrants $F_{(3,132)} = 71,42$, $p < 0,001$; Test de comparaisons multiples de Sidak : WT vs SNCA quadrant SE $p = 0,009$, $p < 0,01$; Test de comparaisons multiples de Tukey : **WT**, SE vs NE, NO ou SO $p < 0,001$, **SNCA**, SE vs NE $p = 0,009$, $p < 0,01$, SE vs NO ou SO $p < 0,001$; Test t de comparaison d'une moyenne à un standard (15) : **WT**, SE et NO $p < 0,001$, NE $p = 0,021$, $p < 0,05$, SO $p = 0,087$, **SNCA**, SE et NO $p < 0,001$, NE $p = 0,395$, SO $p = 0,688$). **(G)** Nombre d'entrées (ANOVA à mesures répétées : pas d'effet du délai de rappel $F_{(1,33)} = 3,77$, $p = 0,061$; Test t de Student : 21j WT vs SNCA $p = 0,059$) et **(H)** temps passé (ANOVA à mesures répétées : pas d'effet génotype $F_{(1,33)} = 3,36$, $p = 0,076$; Mann Whitney : 21j WT vs SNCA $p = 0,044$, $p < 0,05$) dans la zone plateforme + annulus lors des rappels. **(I)** Pourcentage du temps d'exploration des objets lors de l'acquisition de la tâche de localisation d'objet, et comparaison au hasard (33%) (ANOVA à deux facteurs : effet objet $F_{(2,98)} = 4,46$, $p = 0,014$; Test t de comparaison d'une moyenne à un standard (33) : **WT** Savon $p = 0,002$, $p < 0,01$, Coupe $p = 0,534$, **SNCA** Verre $p = 0,170$, Coupe $p = 0,556$; Test des rangs signés de Wilcoxon de comparaison d'une médiane à un standard (33) : WT Verre $p = 0,097$, SNCA Savon $p = 0,083$). **(J)** Temps d'exploration totale des objets lors de l'acquisition de la tâche de localisation d'objet (ANOVA à mesures répétées : effet jour $F_{(1,32)} = 5,87$, $p = 0,021$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 20$ WT + 15 SNCA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparé au hasard. SE, Sud-Est ; NE, Nord-Est ; NO, Nord-Ouest ; SO, Sud-Ouest.



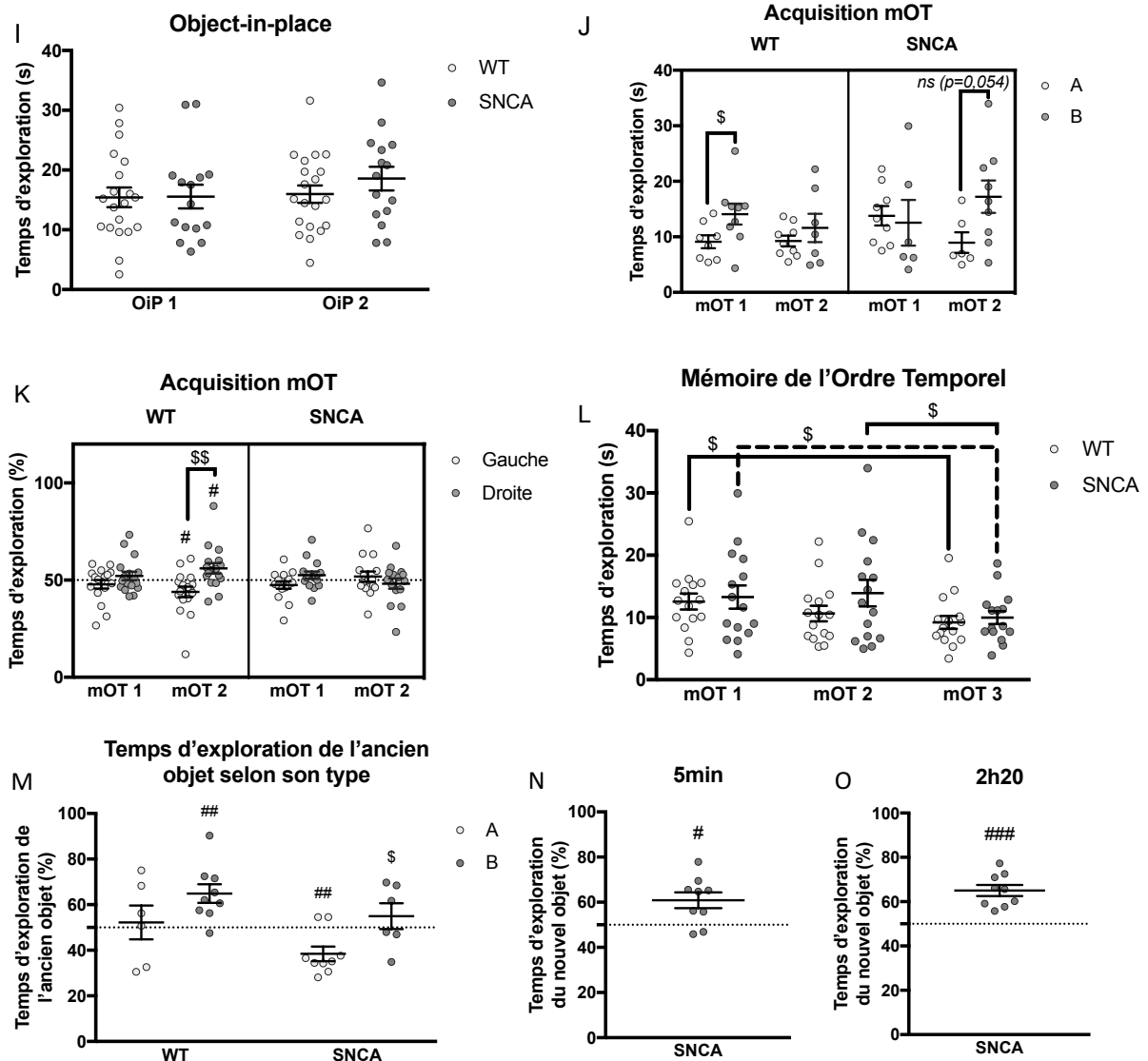


Figure S5. Vérifications de divers paramètres pour la réalisation des tests objets. (A) Temps d'exploration totale des objets lors de l'habituation (ANOVA à mesures répétées : effet phase (Hab 1 vs Hab 2) $F_{(1,33)} = 93,4$, $p < 0,001$; Test de comparaisons multiples de Sidak : Hab 1 vs Hab 2 $p < 0,001$ pour WT et SNCA). (B) Temps d'exploration totale des objets lors de la RNO (ANOVA à mesures répétées : effet phase (RNO 1 vs RNO 2) $F_{(1,28)} = 9,7$, $p = 0,004$, $p < 0,01$; Test de comparaisons multiples de Sidak : RNO 1 vs RNO 2 WT $p = 0,017$, $p < 0,05$, SNCA $p = 0,224$). (C) Placement des objets lors de la phase d'acquisition de la RNO, en positions « avant » et « arrière ». (D) Temps d'exploration respectifs des objets A et B lors de la phase d'acquisition de la RNO (Test t de Student : A vs B pour chaque segment de temps et chaque génotype $p = n.s.$). (E) Temps d'exploration des objets selon leur position lors de la phase d'acquisition de la RNO, exprimé en secondes (Test t de Student : arrière vs avant pour chaque segment de temps et chaque génotype $p = n.s.$), ou (F) en pourcentage du temps d'exploration des objets par rapport au temps d'exploration totale (Test t de Student : 0-10min WT $p = 0,047$, $p < 0,05$; Test de comparaison d'une moyenne à un standard (50) : 0-10min WT $p = 0,162$; Test des rangs signés de Wilcoxon de comparaison d'une médiane à un standard : 0-10min SNCA $p = 0,762$).

G) Pourcentage du temps d'exploration des objets A et B par rapport au temps total d'exploration lors de la phase d'acquisition de l'OiP (Test de Mann Whitney : A vs B WT $p = 0,012$, $p < 0,05$; Test t de Student : A vs B SNCA $p = 0,017$, $p < 0,05$; Test des rangs signés de Wilcoxon de comparaison d'une médiane à un standard (50) : WT $p = 0,074$; Test t de comparaison d'une moyenne à un standard (50) : SNCA $p = 0,095$). **(H)** Pourcentage du temps d'exploration des objets selon leur position durant la phase d'acquisition de l'OiP. Les souris WT et SNCA explorent autant les objets à gauche qu'à droite. **(I)** Temps d'exploration totale des objets par les souris WT et SNCA lors de l'OiP (ANOVA à mesures répétées : pas d'effet génotype $F_{(1,33)} = 0,409$, $p = 0,527$). **(J)** Temps d'exploration respectifs des objets A et B lors de la phase d'acquisition de la mOT (Test t de Student mOT 1 WT $p = 0,046$, $p < 0,05$, mOT 2 SNCA $p = 0,054$). **(K)** Pourcentage du temps d'exploration des objets selon leur position durant la phase d'acquisition de la mOT (Test de Mann Whitney : mOT 1 SNCA $p = 0,069$; Test t de Student : mOT 2 WT $p = 0,003$, $p < 0,01$; Test t de comparaison d'une moyenne à un standard (50) : mOT 2 WT $p = 0,039$, $p < 0,05$). **(L)** Temps d'exploration totale des objets par les souris WT et SNCA lors de la tâche de mOT (ANOVA à mesures répétées : effet phases ($F_{(2,56)} = 6,7$, $p = 0,003$, $p < 0,01$; Test de comparaisons multiples de Tukey : mOT 1 vs mOT 3 WT $p = 0,044$, $p < 0,05$, SNCA $p = 0,048$, $p < 0,05$, mOT 2 vs mOT 3 SNCA $p = 0,015$). **(M)** Temps d'exploration des objets A et B lorsqu'ils sont les objets anciens lors du mOT3 (Test t de Student : WT $p = 0,130$, WT vs SNCA B $p = 0,169$; Test de Mann Whitney : SNCA $p = 0,036$, $p < 0,05$; Test t de comparaison d'une moyenne à un standard (50) : WT A $p = 0,774$, B $p = 0,007$, $p < 0,01$, SNCA B $p = 0,422$; Test des rangs signés de Wilcoxon de comparaison d'une médiane à un standard (50) : SNCA A $p = 0,007$, $p < 0,01$). **(N, O)** Temps d'exploration du nouvel objet en pourcentage lors de tests de RNO complémentaires, avec un délai de **(N)** 5 min (Test t de comparaison d'une moyenne à un standard : $p = 0,015$, $p < 0,05$) ou de **(O)** 2h20 (Test t de comparaison d'une moyenne à un standard : $p < 0,001$) entre l'acquisition et la rétention. Ces tests ont uniquement été réalisés chez des souris SNCA et le pourcentage du temps d'exploration est comparé uniquement au hasard (50%). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ((B, D-F) $n = 16$ WT + 14 SNCA, (A, G-I) $n = 20$ WT + 15 SNCA, (J-L) $n = 15$ WT + 15 SNCA, (M-N) $n = 9$ SNCA). * $p < 0,05$; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ comparé au hasard ; \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$. RNO, reconnaissance de nouvel objet ; OiP, object-in-place ; mOT, mémoire de l'ordre temporel.

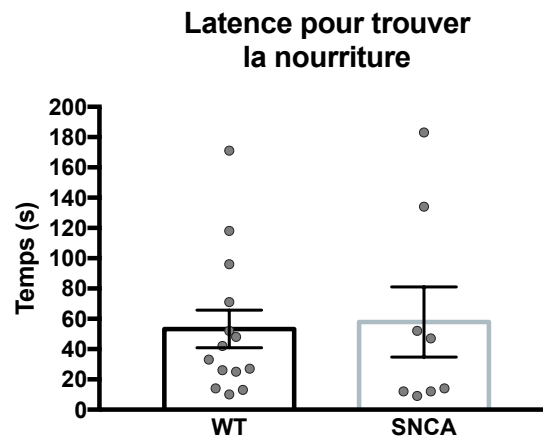


Figure S6. Les souris SNCA âgées de 12-14 mois ne présentent pas de déficit olfactif dans une tâche d'enfouissement de nourriture. La latence avant de trouver la nourriture enterrée dans une litière propre est mesurée pour chaque souris. Les souris WT et SNCA mettent en moyenne le même temps pour réaliser la tâche (Mann Whitney : $p = 0,652$). Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM ($n = 14$ WT + 8 SNCA).

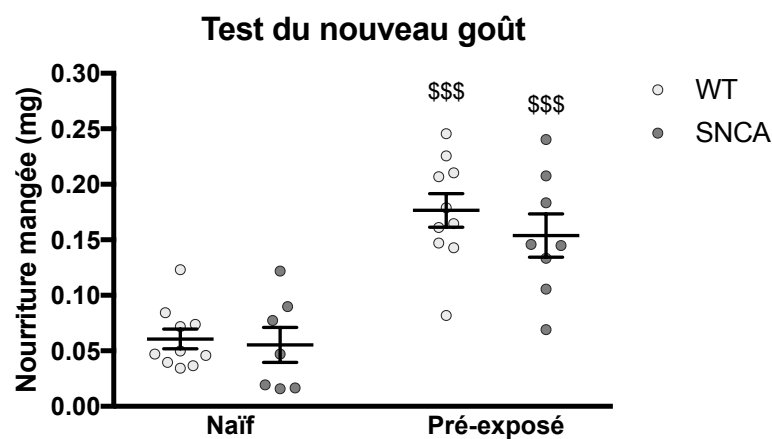


Figure S7. Les souris SNCA ne diffèrent pas des souris WT dans la tâche du nouveau goût à 12-14 mois. La quantité de nourriture mangée est mesurée en pesant la nourriture avant et après le test. Les souris du groupe pré-exposé consomment plus de nourriture que celles du groupe naïf (ANOVA à deux facteurs : effet groupe $F_{(1,31)} = 51,2$, $p < 0,001$, pas d'effet génotype $F_{(1,31)} = 0,874$, $p = 0,357$; Test de comparaisons multiples de Sidak : Naïf vs Pré-exposé $p < 0,001$). Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM ($n = 20$ WT + 15 SNCA). \$\$\$ $p < 0,001$ par rapport au groupe naïf du même génotype.

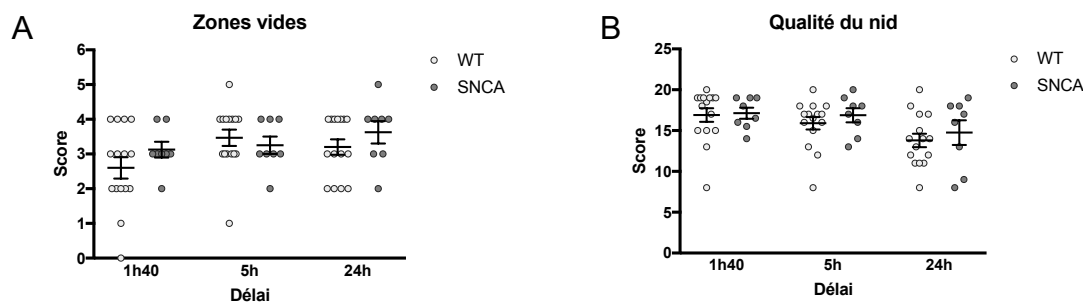


Figure S8. La capacité de faire son nid n'est pas affectée chez les souris SNCA à 12-14 mois. (A) Nombre moyen de zones vides après 1h40, 5h et 24h (Test de Mann Whitney : WT vs SNCA, 1h40 $p = 0,330$, 5h $p = 0,484$, 24h $p = 0,315$). (B) Score moyen de qualité après 1h40, 5h et 24h (Test de Mann Whitney : WT vs SNCA, 1h40 $p = 0,831$, 5h $p = 0,416$, 24h $p = 0,454$). Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM (n = 15 WT + 8 SNCA).

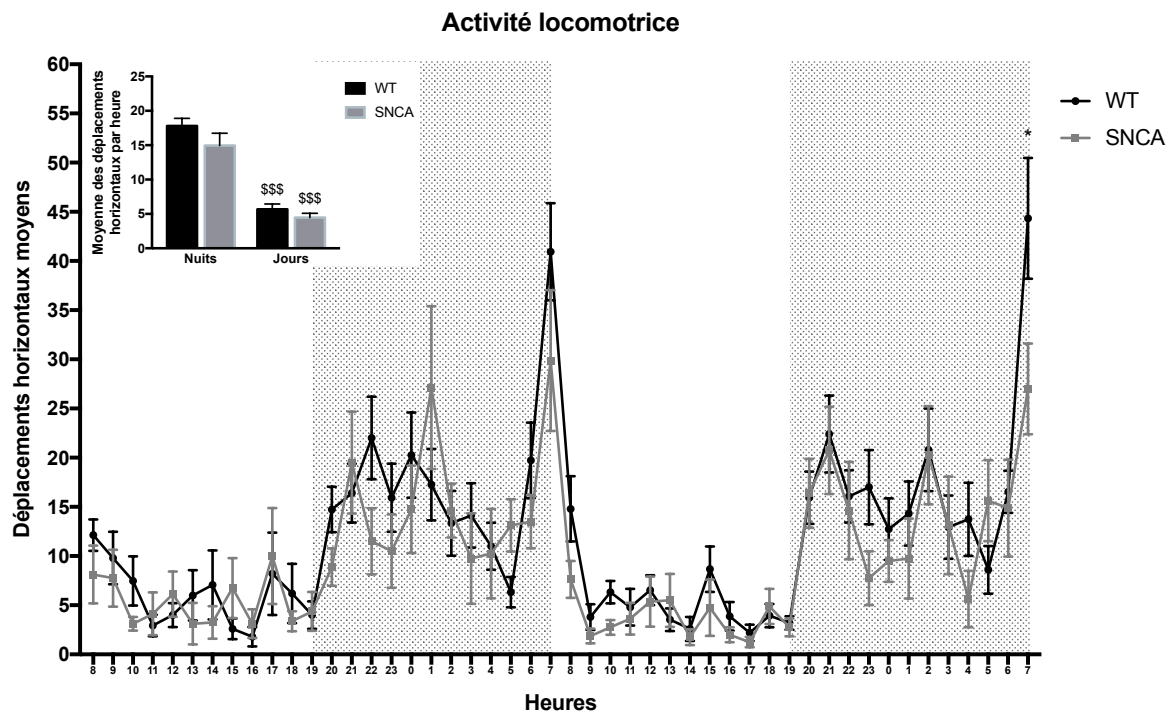


Figure S9. Les souris SNCA ont une activité locomotrice identique à celles des souris WT à 12-14 mois. Le croisement successif des deux faisceaux infrarouges à chaque extrémité de la cage est compté comme un déplacement horizontal. L'activité locomotrice des souris WT et SNCA est représentée par les déplacements horizontaux par heure durant deux nuits et deux jours (ANOVA à mesures répétées : effet heures $F_{(47,887)} = 11,33$, $p < 0,001$, pas d'effet génotype $F_{(1,21)} = 2,408$, $p = 0,136$; Test de comparaisons multiples de Sidak : Nuit 2, 7h $p = 0,011$, $p < 0,05$). Encart : moyenne des déplacements horizontaux par heure durant le jour et la nuit (ANOVA à mesures répétées : effet nuits/jours $F_{(1,21)} = 141,3$, $p < 0,001$; Test de comparaisons multiples de Sidak : nuits vs jours, WT et SNCA $p < 0,001$). Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM (n = 15 WT + 8 SNCA). \$\$\$ $p < 0,001$ par rapport à la nuit.

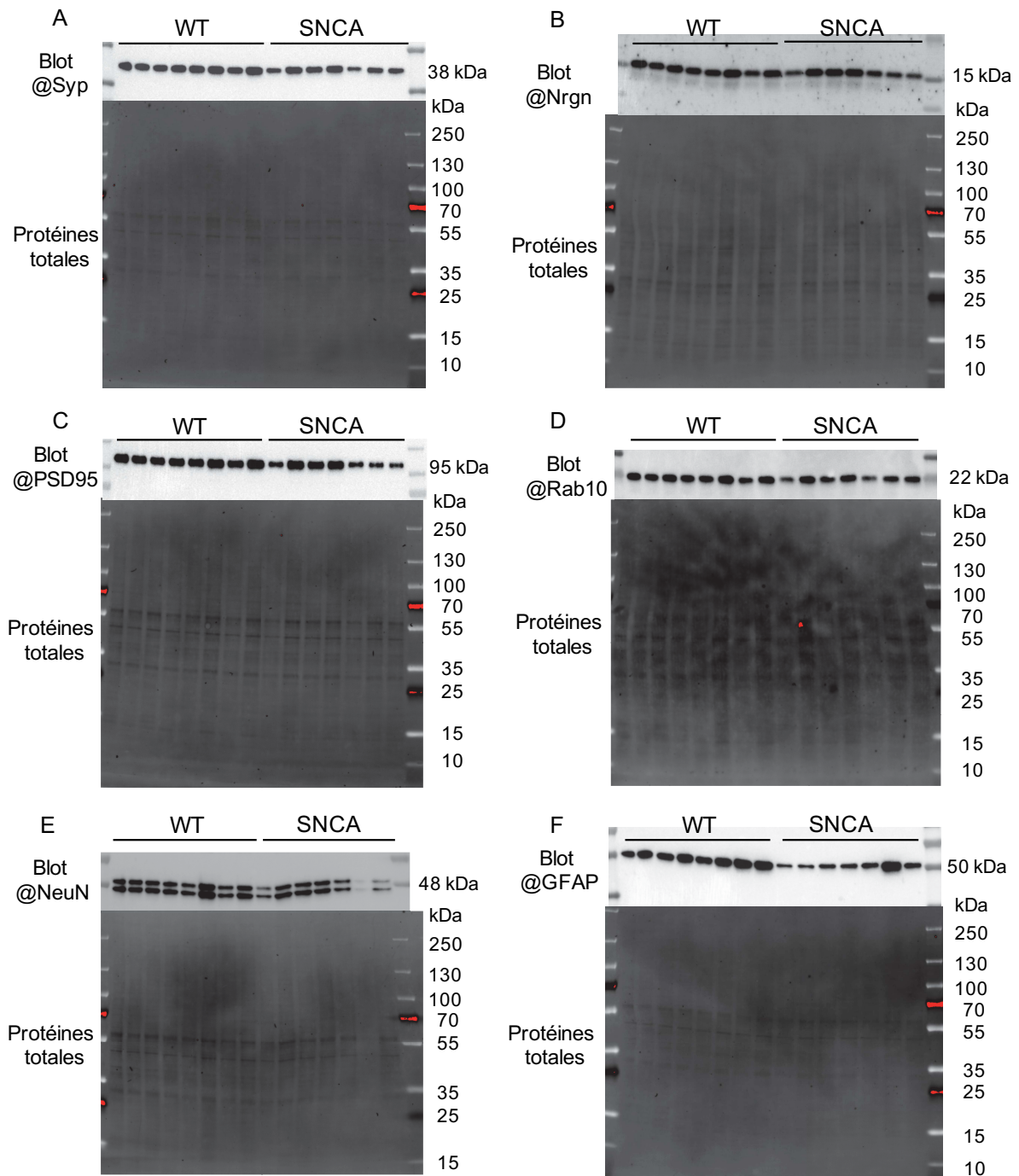


Figure S11.1. Western blots et membranes présentant les protéines totales pour quantification de la synaptophysine, la neurogranine, PSD95, Rab10, NeuN et GFAP dans le CF des souris WT et SNCA âgées de 14 mois. (A) Synaptophysine (Syp). (B) Neurogranine (Nrgn). (C) PSD95. (D) Rab10. (E) Neuronal Nucleus (NeuN). (F) Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP).

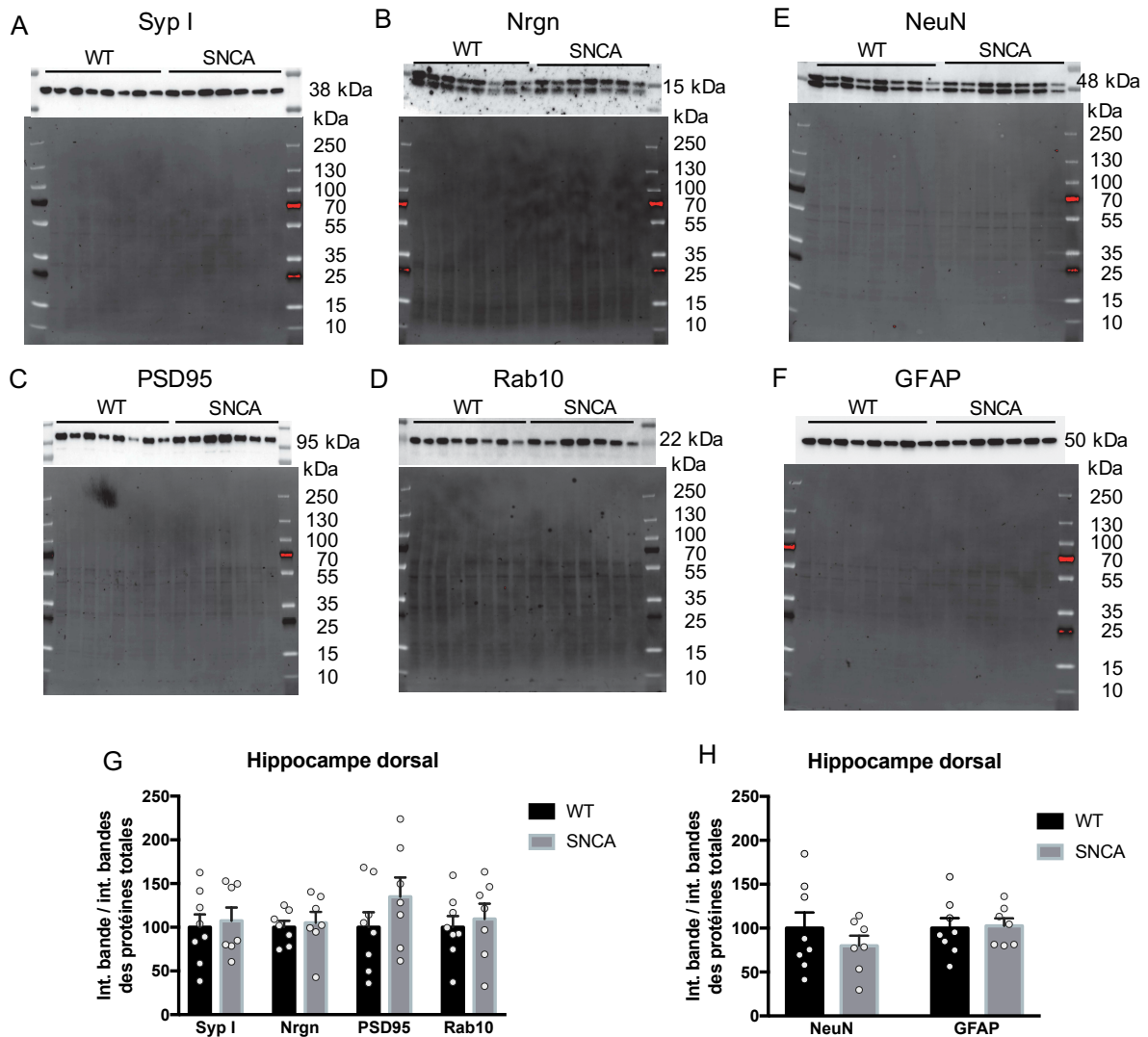


Figure S11.2. Taux protéiques des marqueurs synaptiques, axonal, nucléaire et astrocytaire dans l'HD des souris WT et SNCA âgées de 14 mois. (A-F) Western blot représentatifs et membranes présentant la migration des protéines totales extraites de l'HD. (A) Synaptophysine (Syp). (B) Neurogranine (Nrgn). (C) PSD95. (D) Rab10. (E) Neuronal Nucleus (NeuN). (F) Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). (G) Quantification des Western blots représentés de (A) à (D). (H) Quantification des Western blots représentés en (E) et (F). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 8$ WT + 7 SNCA). *Syp I*, *synaptophysine I*; *Nrgn*, *neurogranine*; *NeuN*, *neuronal nucleus*; *GFAP*, *glial fibrillary acidic protein*.

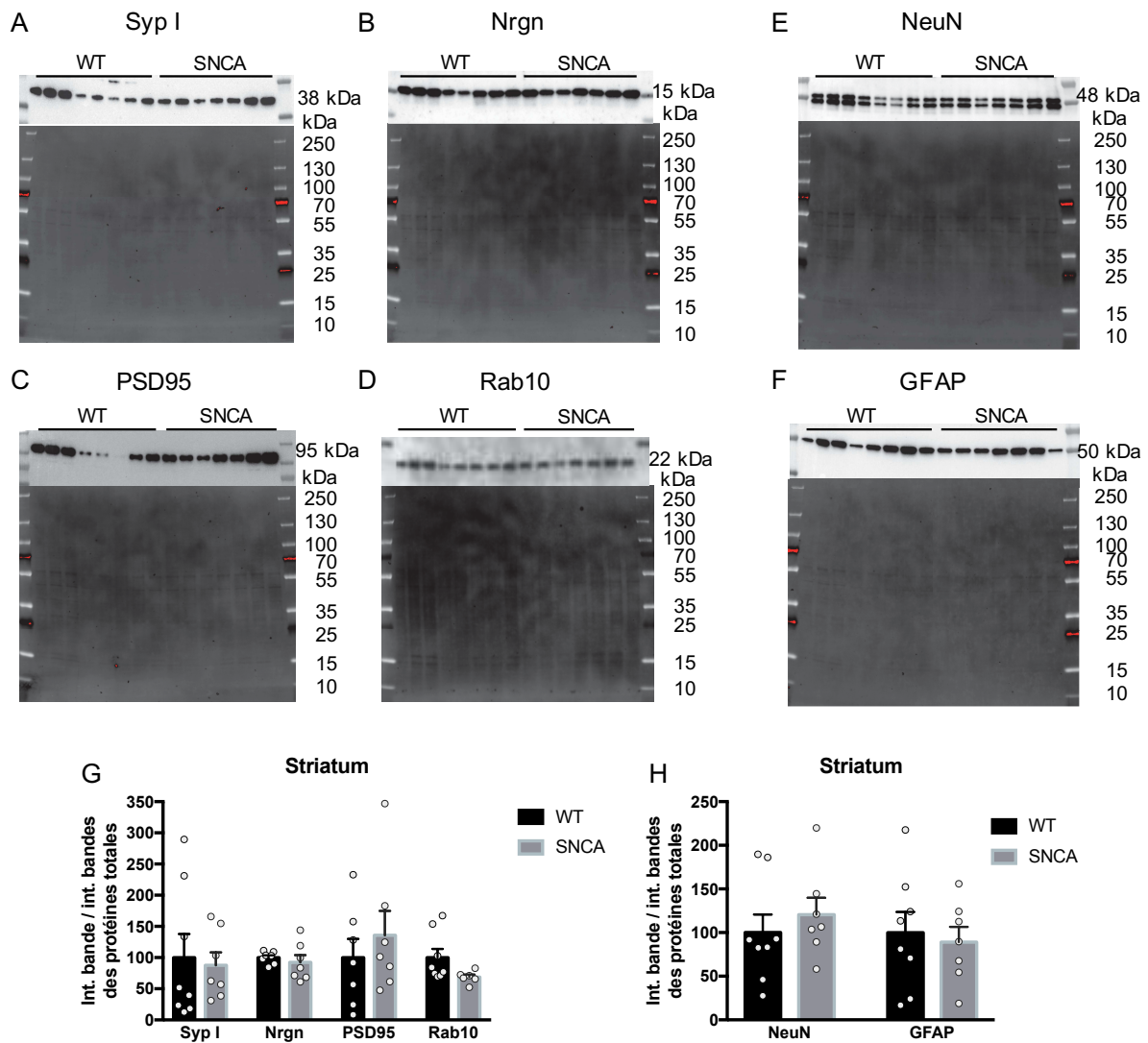


Figure S11.3. Taux protéiques de marqueurs synaptiques, axonal, nucléaire et astrocytaire dans le Str des souris WT et SNCA âgées de 14 mois. (A-F) Western blot représentatifs et membrane présentant la migration des protéines totales extraites du Str. (A) Synaptophysine (Syp). (B) Neurogranine (Nrgn). (C) PSD95. (D) Rab10. (E) Neuronal Nucleus (NeuN). (F) Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). (G) Quantification des Western blots représentés de (A) à (D) (Test de Mann Whitney : Rab10 $p = 0,094$). (H) Quantification des Western Blots représentés en (E) et (F). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 8WT + 7SNCA$). Syp I, synaptophysine I ; Nrgn, neurogranine ; NeuN, neuronal nucleus ; GFAP, glial fibrillary acidic protein.

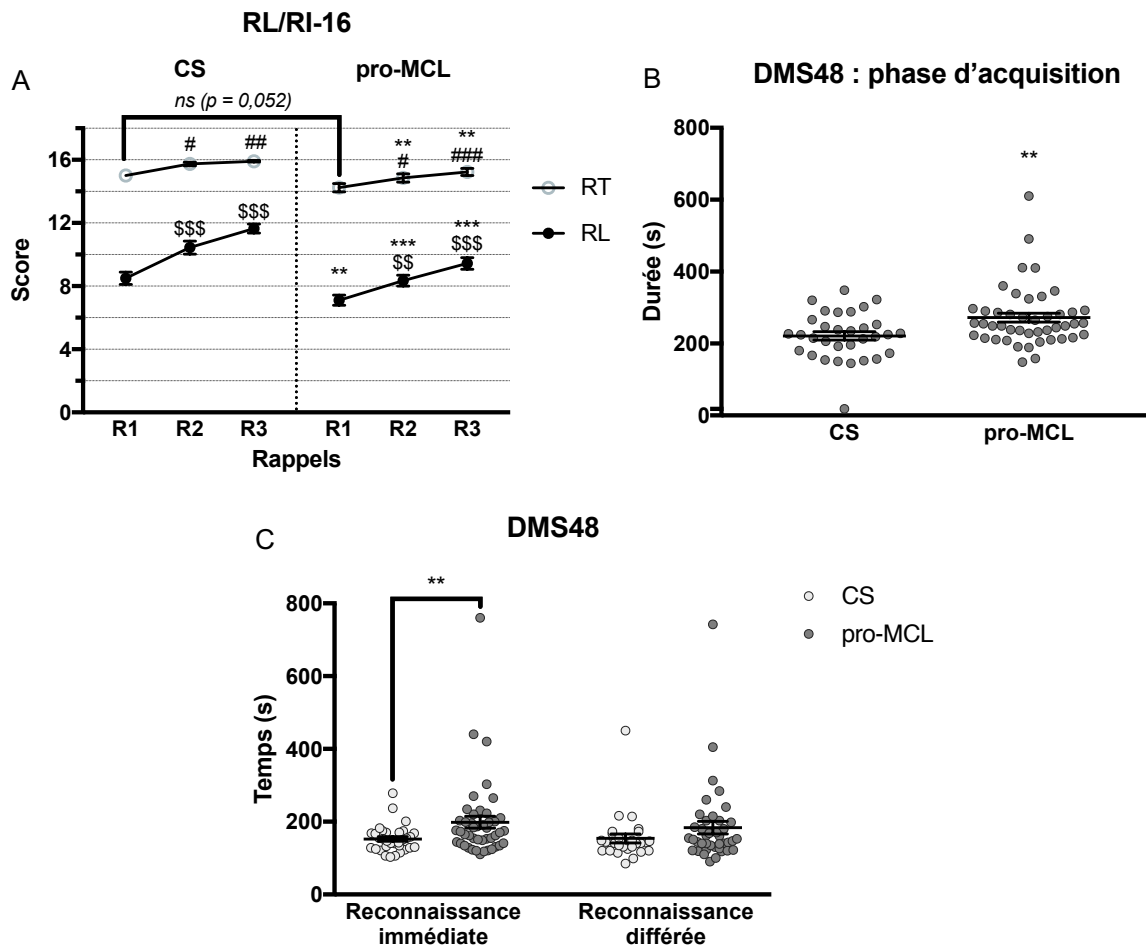


Figure S12. Analyses complémentaires des tests neuropsychologiques. (A) Représentation du score des trois rappels libres (RL) et rappels totaux (RT) effectués par les CS et les pro-MCL lors de la tâche de RL/RI-16. Les scores de RL et de RT augmentent au cours des essais (Test de Friedman : $p < 0,001$; Test de comparaisons multiples de Dunn : **CS RL**, R1 vs R2 et R1 vs R3 $p < 0,001$, **CS RT**, R1 vs R2 $p = 0,033$ $p < 0,05$, R1 vs R3 $p = 0,006$, $p < 0,01$, **pro-MCL RL**, R1 vs R2 $p = 0,001$, $p < 0,01$, R1 vs R3 $p < 0,001$, **pro-MCL RT**, R1 vs R2 $p = 0,035$, $p < 0,05$, R1 vs R3 $p < 0,001$; Test de Mann Whitney : CS vs pro-MCL, **RL** R1 $p = 0,005$, $p < 0,01$, R2 et R3 $p < 0,001$, **RT** R1 $p = 0,052$, R2 $p = 0,005$, $p < 0,01$, R3 $p = 0,005$, $p < 0,01$). (B) Durée moyenne de la phase d'acquisition du DMS48 pour les CS et les pro-MCL (Test de Mann Whitney : $p = 0,001$, $p < 0,01$). (C) Durée moyenne des phases de reconnaissances immédiates et différées effectuées par les CS et les pro-MCL (Test de Mann Whitney : **CS vs pro-MCL**, RI $p = 0,0096$, $p < 0,01$, RD $p = 0,159$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ((A) $n = 34$ CS + 55 pro-MCL, (B) $n = 32$ CS + 45 pro-MCL, (C) $n = 32$ CS + 45 pro-MCL reconnaissance immédiate, $n = 28$ CS + 40 pro-MCL reconnaissance différée). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparé aux CS ; \$\$\$ $p < 0,001$ comparé respectivement au R1 de chaque groupe en RL ; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparé respectivement au R1 de chaque groupe en RT. RL, rappel libre ; RT, rappel total ; RI, reconnaissance immédiate ; RD, reconnaissance différée.

XII. Annexes

Comportement	Western blot	Immunohistochimie / Marquage histologique
12-14 mois n = 20 WT + 15 SNCA	14 mois n = 8 WT + 7 SNCA	14 mois n = 4 WT + 3 SNCA
Groupe 1 : n = 15 WT + 8 SNCA		
Groupe 2 (5 mois plus tard): n = 5 WT + 7 SNCA		
Tests réalisés	Protéines cibles	IHC : protéine cible
<ul style="list-style-type: none"> • Piscine de Morris • Tests de reconnaissances d'objets : <ul style="list-style-type: none"> ○ Localisation d'objet, délai 3h ○ Reconnaissance de nouvel objet, délai 3h ○ « Object-in-place », délai 5 min ○ Mémoire de l'ordre temporel, délai d'1h • Test de détection d'odeur (nourriture enfouie) • Test d'apprentissage d'un nouveau goût • Nesting (fabrication du nid) • Activité locomotrice spontanée 	<ul style="list-style-type: none"> • α-syn humaine ($h\alpha$-syn) • α-syn phosphorylée sur la sérine 129 (α-syn pS129) • α-syn totale (humaine + murine) • GFAP • NeuN • Neurogranine • PSD 95 • Rab 10 • Synaptophysine I 	<p>α-syn phosphorylée sur la sérine 129 (α-syn pS129)</p> <hr/> <p>Structures d'intérêt</p> <hr/> <p>Ensemble du cerveau (lames scannées au Nanozoomer)</p> <hr/> <p>Crésyl Violet</p> <hr/> <p>Mesures d'épaisseurs des couches cellulaires de l'hippocampe dorsal (CA1, CA3, gyrus denté)</p>
12 mois	6 mois (p. 115)	
n = 9 SNCA	n = 6 WT + 6 SNCA	
Tests réalisés	Protéines cibles	
Tests de reconnaissance de nouvel objet complémentaires : délais 5 min et 2h20	α -syn humaine ($h\alpha$ -syn) actine	
	Structures d'intérêt	
	<ul style="list-style-type: none"> • Cortex frontal • Hippocampe dorsal 	
18 mois		
n = 8 WT + 7 SNCA		
Test de coordination motrice (test de la barre)		

Annexe 1. Manipulations réalisées sur le modèle SNCA. Chaque couleur représente une cohorte différente. Toutes les souris sont des mâles. La cohorte SNCA ayant permis la caractérisation comportementale à 12-14 mois est constituée de deux groupes de souris nées à 5 mois d'écart, et donc testées à 5 mois d'écart, en reproduisant au maximum les mêmes conditions.

Chirurgie unilatérale	Immunohistochimie + Immunofluorescence	Transparisation + Immunofluorescence
4 mois	8 mois = 4 mois post-injection (mise au point)	
n = 4 WT FIB + 4 SNCA FIB	n = 4 WT FIB + 4 SNCA FIB	
	Protéine cible	
	α -syn phosphorylée sur la sérine 129 (α -syn pS129)	
	Structures d'intérêt	
	IHC : ensemble du cerveau (pour observer propagation) IF : Cortex insulaire (site d'injection)	
5 mois	Modèle « WT FIB »	12 mois = 7 mois post-injection
n = 12 WT PBS + 12 WT FIB		n = 6 WT PBS + 6 WT FIB
		17 mois = 12 mois post-injection
		n = 6 WT PBS + 6 WT FIB
		Protéine cible
		α -syn phosphorylée sur la sérine 129 (α -syn pS129)
		Structures d'intérêt
		Ensemble du cerveau (transparisation → visualisation 3D)

Annexe 2. Injections unilatérales de fibrilles d' α -syn dans le cortex insulaire antérieur de souris WT.

Chaque couleur représente une cohorte différente. La cohorte en jaune a été utilisée pour la mise au point des injections de fibrilles, afin de vérifier que l'injection de fibrilles induit une pathologie de l' α -syn endogène. La cohorte en bleu utilisée pour l'analyse de la propagation 7 et 12 mois post-injection est constituée de deux groupes de souris nées à 1 mois d'écart. *FIB*, fibrilles ; *h α -syn*, α -syn humaine ; *IF*, immunofluorescence ; *IHC*, immunohistochimie ; *PBS*, tampon phosphate salin ; *WT*, wild-type.

Chirurgie bilatérale	Comportement	Immunohistochimie
5 mois	12-14 mois = 7-9 mois post-injection	14 mois = 9 mois post-injection
n = 13 WT PBS + 9 SNCA PBS + 11 SNCA FIB	n = 13 WT PBS + 9 SNCA PBS + 11 SNCA FIB	n = 3 WT PBS + 3 SNCA PBS + 11 SNCA FIB
Groupe 1 : n = 7 WT PBS + 5 SNCA PBS + 7 SNCA FIB	Groupe 1 : n = 7 WT PBS + 5 SNCA PBS + 7 SNCA FIB	
Groupe 2 (1 mois plus tard) : n = 6 WT PBS + 4 SNCA PBS + 4 SNCA FIB	Groupe 2 (1 mois plus tard) : n = 6 WT PBS + 4 SNCA PBS + 4 SNCA FIB	
	Tests réalisés	Protéine cible
	<ul style="list-style-type: none"> • Labyrinthe en croix surélevé • Piscine de Morris • Tests de reconnaissances d'objets : <ul style="list-style-type: none"> ○ Localisation d'objet, délai 3h ○ Reconnaissance de nouvel objet, délai 3h ○ « Object-in-place », délai 5 min ○ <i>Mémoire de l'ordre temporel, délai d'1h</i> • Test d'apprentissage d'un nouveau goût • Pesée des selles (troubles gastrointestinaux) • Nesting (fabrication du nid) • Activité locomotrice spontanée • Test de coordination motrice (test de la barre) 	<p>α-syn phosphorylée sur la sérine 129 (α-syn pS129) → <i>cartographie n = 1 SNCA FIB</i></p>
		Structures d'intérêt
		Ensemble du cerveau (lames scannées au Nanozoomer)

Annexe 3. Manipulations réalisées sur le modèle SNCA FIB. Injections bilatérales de fibrilles d' α -syn dans le cortex insulaire antérieur. La cohorte est constituée de deux groupes de souris nées à 1 mois d'écart, et donc testées à 1 mois d'écart, en reproduisant au maximum les mêmes conditions. *FIB*, fibrilles ; *h α -syn*, α -syn humaine ; *PBS*, tampon phosphate salin ; *WT*, wild-type.

Chirurgie unilatérale	Immunohistochimie	Transparisation + Immunofluorescence
4 mois	8 mois = 4 mois post-injection	8 mois = 4 mois post-injection
n = 2 WT FIB ♂ + 4 WT FIB ♀	n = 1 WT FIB ♂	n = 1 WT FIB ♂
	Protéine cible	Protéine cible
	α-syn phosphorylée sur la sérine 129 (α-syn pS129)	α-syn phosphorylée sur la sérine 129 (α-syn pS129)
	Structures d'intérêt	Structures d'intérêt
	Ensemble du cerveau (pour observer propagation)	Ensemble du cerveau (transparisation → visualisation 3D)
		Protéines cibles (réhydratation et coupe du cerveau transparisé)
		α-syn phosphorylée sur la sérine 129 (α-syn pS129)
		NeuN
		GFAP
		Structures d'intérêt
		Striatum dorsal
		Cortex
		→ à proximité du site d'injection

Annexe 4. Injections unilatérales de fibrilles dans le striatum dorsal. Ces chirurgies ont été réalisées dans le cadre de la mise au point des injections de fibrilles, et dans la mise au point de l'immunofluorescence α-syn pS129 après transparisation. *FIB*, fibrilles ; *hα-syn*, α-syn humaine ; *WT*, wild-type.

Annexe 5. Communications scientifiques.

- **Articles**

Schueller E, Brigitte Cosquer, Louis K, Reinwalt C, Cassel J-C, Blanc F, Boutillier A-L, Bousiges O. Behavioral and pathophysiological characterization of a new mouse model mimicking prodromal stage of dementia with Lewy bodies. *En cours de rédaction*

Schueller E, Paiva I, Blanc F, Wang X-L, Cassel J-C, Boutillier A-L, Bousiges O (2020)
Dysregulation of histone acetylation pathways in hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *European Neuropsychopharmacology* Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X20300407>

- **Communications orales et posters**

Poster – Journée d'accueil des étudiants de master en Neurosciences de l'Université de Strasbourg, organisée par Doctoneuro, Septembre 2019.

Schueller E, Cosquer B, Louis K, Reinwalt C, Cassel J-C, Boutillier A-L, Bousiges O.
Development and characterization of a new mouse model of dementia with Lewy bodies.

Poster – 7èmes journées scientifiques de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), 25 et 26 Avril 2019. Obtention du prix du meilleur poster.

Schueller E, Cosquer B, Louis K, Reinwalt C, Cassel J-C, Boutillier A-L, Bousiges O.
Development and characterization of a new mouse model of dementia with Lewy bodies.

Poster – 14th AD/PD international conference, Mars 2019

Schueller E, Cosquer B, Louis K, Reinwalt C, Cassel J-C, Boutillier A-L, Bousiges O.
Development and characterization of a new mouse model of dementia with Lewy bodies.

Communication orale (Data Blitz) – Journée du Neuropôle de Strasbourg, Février 2019.

Obtention d'un prix des trois meilleurs Data Blitz.

Recognition memory deficits in a new mouse model of dementia with Lewy bodies.

Poster – Journée d'accueil des étudiants de master en Neurosciences de l'Université de Strasbourg, organisée par Doctoneuro, Septembre 2018.

Schueller E, Cosquer B, Reinwalt C, Cassel J-C, Boutillier A-L, Bousiges O. Development and characterization of a new mouse model of dementia with Lewy bodies.

XIII. Bibliographie

- Aarsland D, Ballard C, McKeith I, Perry RH, Larsen JP (2001) Comparison of Extrapyrarnidal Signs in Dementia With Lewy Bodies and Parkinson's Disease. *JNP* 13:374–379.
- Aarsland D, Perry R, Brown A, Larsen JP, Ballard C (2005) Neuropathology of dementia in Parkinson's disease: a prospective, community-based study. *Ann Neurol* 58:773–776.
- Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho W-H, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JMG, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000) Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System. *Neuron* 25:239–252.
- Adamowicz DH, Roy S, Salmon DP, Galasko DR, Hansen LA, Masliah E, Gage FH (2017a) Hippocampal α -Synuclein in Dementia with Lewy Bodies Contributes to Memory Impairment and Is Consistent with Spread of Pathology. *J Neurosci* 37:1675–1684.
- Adamowicz DH, Roy S, Salmon DP, Galasko DR, Hansen LA, Masliah E, Gage FH (2017b) Hippocampal α -Synuclein in Dementia with Lewy Bodies Contributes to Memory Impairment and Is Consistent with Spread of Pathology. *J Neurosci* 37:1675–1684.
- Alam P, Bousset L, Melki R, Otzen DE (2019) α -synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities. *Journal of Neurochemistry* 150:522–534.
- Alarcón-Arís D, Recasens A, Galofré M, Carballo-Carbajal I, Zacchi N, Ruiz-Bronchal E, Pavia-Collado R, Chica R, Ferrés-Coy A, Santos M, Revilla R, Montefeltro A, Fariñas I, Artigas F, Vila M, Bortolozzi A (2018) Selective α -Synuclein Knockdown in Monoamine Neurons by Intranasal Oligonucleotide Delivery: Potential Therapy for Parkinson's Disease. *Molecular Therapy* 26:550–567.
- Anderson JP et al. (2006) Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of α -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease. *J Biol Chem* 281:29739–29752.
- Anon (2019) Memory Encoding | Memory Processes Storage & Retrieval. The Human Memory Available at: <https://human-memory.net/memory-encoding/>.
- Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J, Aasly JO, Rajput A, Rajput AH, Jon Stoessl A, Farrer MJ (2013) Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord* 28:811–813.
- Atkinson RC, Shiffrin RM (1968) Human Memory: A Proposed System and its Control Processes¹¹This research was supported by the National Aeronautics and Space Administration, Grant No. NGR-05-020-036. The authors are indebted to W. K. Estes and G. H. Bower who provided many valuable suggestions and comments at various stages of the work. Special credit is due J. W. Brelsford who was instrumental in carrying out the research discussed in Section IV and whose overall contributions are too numerous to report in detail. We should also like to thank those co-workers who carried out a number of the experiments discussed in the latter half of the paper; rather than list them here, each will be acknowledged at the appropriate place. In:

Psychology of Learning and Motivation (Spence KW, Spence JT, eds), pp 89–195. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079742108604223>.

- Atkinson RC, Shiffrin RM (1971) The control of short-term memory. *Sci Am* 225:82–90.
- Azeredo da Silveira S, Schneider BL, Cifuentes-Diaz C, Sage D, Abbas-Terki T, Iwatsubo T, Unser M, Aebischer P (2009) Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of alpha-synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 18:872–887.
- Baba T, Kikuchi A, Hirayama K, Nishio Y, Hosokai Y, Kanno S, Hasegawa T, Sugeno N, Konno M, Suzuki K, Takahashi S, Fukuda H, Aoki M, Itoyama Y, Mori E, Takeda A (2012) Severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with Parkinson's disease: a 3 year longitudinal study. *Brain* 135:161–169.
- Ballard C, McKeith I, Burn D, Harrison R, O'Brien J, Lowery K, Campbell M, Perry R, Ince P (1997) The UPDRS scale as a means of identifying extrapyramidal signs in patients suffering from dementia with Lewy bodies. *Acta Neurol Scand* 96:366–371.
- Barbeau E, Didic M, Tramonì E, Felician O, Joubert S, Sontheimer A, Ceccaldi M, Poncet M (2004) Evaluation of visual recognition memory in MCI patients. *Neurology* 62:1317–1322.
- Barker GRI, Bird F, Alexander V, Warburton EC (2007) Recognition Memory for Objects, Place, and Temporal Order: A Disconnection Analysis of the Role of the Medial Prefrontal Cortex and Perirhinal Cortex. *J Neurosci* 27:2948–2957.
- Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ (2011) α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477:107–110.
- Bereczki E, Branca RM, Francis PT, Pereira JB, Baek J-H, Hortobágyi T, Winblad B, Ballard C, Lehtiö J, Aarsland D (2018) Synaptic markers of cognitive decline in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Brain* 141:582–595.
- Bereczki E, Francis PT, Howlett D, Pereira JB, Höglund K, Bogstedt A, Cedazo-Minguez A, Baek J-H, Hortobágyi T, Attems J, Ballard C, Aarsland D (2016) Synaptic proteins predict cognitive decline in Alzheimer's disease and Lewy body dementia. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 12:1149–1158.
- Bernis ME, Babila JT, Breid S, Wüsten KA, Wüllner U, Tamgüney G (2015) Prion-like propagation of human brain-derived alpha-synuclein in transgenic mice expressing human wild-type alpha-synuclein. *Acta Neuropathol Commun* 3:75.
- Bertoncini CW, Jung Y-S, Fernandez CO, Hoyer W, Griesinger C, Jovin TM, Zweckstetter M (2005) Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1430–1435.
- Blanc F, Colloby SJ, Cretin B, de Sousa PL, Demuyneck C, O'Brien JT, Martin-Hunyadi C, McKeith

- I, Philippi N, Taylor J-P (2016) Grey matter atrophy in prodromal stage of dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 8:31.
- Blanc F, Colloby SJ, Philippi N, Pétigny X de, Jung B, Demuynck C, Phillipps C, Anthony P, Thomas A, Bing F, Lamy J, Martin-Hunyadi C, O'Brien JT, Cretin B, McKeith I, Armspach J-P, Taylor J-P (2015) Cortical Thickness in Dementia with Lewy Bodies and Alzheimer's Disease: A Comparison of Prodromal and Dementia Stages. *PLOS ONE* 10:e0127396.
- Blanc F, Noblet V, Philippi N, Cretin B, Foucher J, Armspach J-P, Rousseau F, Initiative the ADN (2014) Right Anterior Insula: Core Region of Hallucinations in Cognitive Neurodegenerative Diseases. *PLOS ONE* 9:e114774.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232:331–356.
- Bodner CR, Maltsev AS, Dobson CM, Bax A (2010) Differential phospholipid binding of alpha-synuclein variants implicated in Parkinson's disease revealed by solution NMR spectroscopy. *Biochemistry* 49:862–871.
- Boedtker E, Praetorius J, Füchtbauer E-M, Aalkjaer C (2008) Antibody-independent localization of the electroneutral Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCn1 (slc4a7) in mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 294:C591–C603.
- Boot BP (2015) Comprehensive treatment of dementia with Lewy bodies. *Alz Res Therapy* 7:1–8.
- Boot BP, Orr CF, Ahlskog JE, Ferman TJ, Roberts R, Pankratz VS, Dickson DW, Parisi J, Aakre JA, Geda YE, Knopman DS, Petersen RC, Boeve BF (2013) Risk factors for dementia with Lewy bodies: A case-control study. *Neurology* 81:833–840.
- Bousiges O, Blanc F (2019) Diagnostic value of cerebro-spinal fluid biomarkers in dementia with lewy bodies. *Clinica Chimica Acta* 490:222–228.
- Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, Madiona K, Olieric V, Böckmann A, Meier BH, Melki R (2013) Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* 4:2575.
- Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K (2003a) Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* 110:517–536.
- Braak H, Sastre M, Del Tredici K (2007) Development of α -synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 114:231–241.
- Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E (2003b) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* 24:197–211.
- Bras J et al. (2014) Genetic analysis implicates APOE, SNCA and suggests lysosomal dysfunction

- in the etiology of dementia with Lewy bodies. *Hum Mol Genet* 23:6139–6146.
- Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2015) Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci* 16:109–120.
- Brettschneider J, Irwin DJ, Boluda S, Byrne MD, Fang L, Lee EB, Robinson JL, Suh E, Van Deerlin VM, Toledo JB, Grossman M, Hurtig H, Dengler R, Petri S, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2017) Progression of alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy of the cerebellar type. *Neuropathol Appl Neurobiol* 43:315–329.
- Breydo L, Wu JW, Uversky VN (2012) A-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1822:261–285.
- Brown MW, Aggleton JP (2001) Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Reviews Neuroscience* 2:51–61.
- Bruening W, Giasson BI, Klein-Szanto AJ, Lee VM, Trojanowski JQ, Godwin AK (2000) Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer* 88:2154–2163.
- Buell AK (2017) Chapter Five - The Nucleation of Protein Aggregates - From Crystals to Amyloid Fibrils. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* (Sandal M, ed), pp 187–226 Early Stage Protein Misfolding and Amyloid Aggregation. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644816300831>.
- Buell AK, Galvagnion C, Gaspar R, Sparr E, Vendruscolo M, Knowles TPJ, Linse S, Dobson CM (2014) Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:7671–7676.
- Burré J (2015) The Synaptic Function of α -Synuclein. *J Parkinsons Dis* 5:699–713.
- Burré J, Sharma M, Südhof TC (2014) α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E4274–E4283.
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329:1663–1667.
- Burré J, Vivona S, Diao J, Sharma M, Brunger AT, Südhof TC (2013) Properties of Native Brain α -Synuclein. *Nature* 498:E4–E7.
- Busch DJ, Oliphant PA, Walsh RB, Banks SML, Woods WS, George JM, Morgan JR (2014) Acute increase of α -synuclein inhibits synaptic vesicle recycling evoked during intense stimulation. *MBoC* 25:3926–3941.
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL (2002) Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation in Mice Lacking α -Synuclein. *J Neurosci* 22:8797–8807.

- Celej MS, Sarroukh R, Goormaghtigh E, Fidelio GD, Ruyschaert J-M, Raussens V (2012) Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure. *Biochem J* 443:719–726.
- Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC (2005) α -Synuclein Cooperates with CSP α in Preventing Neurodegeneration. *Cell* 123:383–396.
- Chao OY, Huston JP, Li J-S, Wang A-L, de Souza Silva MA (2016) The medial prefrontal cortex-lateral entorhinal cortex circuit is essential for episodic-like memory and associative object-recognition. *Hippocampus* 26:633–645.
- Chartier-Harlin M-C, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A (2004a) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167–1169.
- Chartier-Harlin M-C, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A (2004b) α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *The Lancet* 364:1167–1169.
- Chen L, Feany MB (2005) Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nat Neurosci* 8:657–663.
- Chen L, Periquet M, Wang X, Negro A, McLean PJ, Hyman BT, Feany MB (2009) Tyrosine and serine phosphorylation of α -synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation. *J Clin Invest* 119:3257–3265.
- Chesselet M-F, Richter F (2011) Modelling of Parkinson's disease in mice. *The Lancet Neurology* 10:1108–1118.
- Chiba Y, Fujishiro H, Iseki E, Ota K, Kasanuki K, Hirayasu Y, Sato K (2012) Retrospective Survey of Prodromal Symptoms in Dementia with Lewy Bodies: Comparison with Alzheimer's Disease. *DEM* 33:273–281.
- Choi W, Zibae S, Jakes R, Serpell LC, Davletov B, Crowther RA, Goedert M (2004) Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human alpha-synuclein. *FEBS Lett* 576:363–368.
- Chung HK, Ho H-A, Pérez-Acuña D, Lee S-J (2019) Modeling α -Synuclein Propagation with Prefomed Fibril Injections. *J Mov Disord* 12:139–151.
- Cohen SJ, Stackman Jr. RW (2015) Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research* 285:105–117.
- Cole TA et al. (2019) Alpha-synuclein antisense oligonucleotides as a disease-modifying therapy for Parkinson's disease. *bioRxiv*:830554.
- Colla E, Jensen PH, Pletnikova O, Troncoso JC, Glabe C, Lee MK (2012) Accumulation of toxic

- α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo. *J Neurosci* 32:3301–3305.
- Colosimo C, Hughes A, Kilford L, Lees A (2003) Lewy body cortical involvement may not always predict dementia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:852–856.
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med* 4:1318–1320.
- Conway KA, Lee S-J, Rochet J-C, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *PNAS* 97:571–576.
- Cooper JM, Wiklander PBO, Nordin JZ, Al-Shawi R, Wood MJ, Vithlani M, Schapira AHV, Simons JP, El-Andaloussi S, Alvarez-Erviti L (2014) Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Mov Disord* 29:1476–1485.
- Corkin S (2002) What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci* 3:153–160.
- Crabtree DM, Zhang J (2012) Genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 88:13–32.
- Cremades N, Chen SW, Dobson CM (2017) Structural Characteristics of α -Synuclein Oligomers. *Int Rev Cell Mol Biol* 329:79–143.
- Cremades N, Cohen SIA, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A, Sandal M, Clarke RW, Dunne P, Aprile FA, Bertocini CW, Wood NW, Knowles TPJ, Dobson CM, Klenerman D (2012) Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell* 149:1048–1059.
- Dam DV, Deyn PPD (2006) Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov* 5:956–970.
- Darios F, Ruipérez V, López I, Villanueva J, Gutierrez LM, Davletov B (2010) α -Synuclein sequesters arachidonic acid to modulate SNARE-mediated exocytosis. *EMBO reports* 11:528–533.
- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM (1998) Stabilization of α -Synuclein Secondary Structure upon Binding to Synthetic Membranes. *J Biol Chem* 273:9443–9449.
- Davis AA, Leyns CEG, Holtzman DM (2018) Intercellular Spread of Protein Aggregates in Neurodegenerative Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 34:545–568.
- Dawson TM, Golde TE, Tourenne CL (2018) Animal Models of Neurodegenerative Diseases. *Nat Neurosci* 21:1370–1379.
- Deaton AM, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25:1010–1022.

- Delenclos M, Moussaud S, McLean PJ (2017) Chapter 7 - Lewy body dementia. In: Disease-Modifying Targets in Neurodegenerative Disorders (Baekelandt V, Lobbestael E, eds), pp 175–198. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128051207000087>.
- Delgado-Morales R, Esteller M (2017) Opening up the DNA methylome of dementia. *Molecular Psychiatry* 22:485–496.
- Desplats P, Lee H-J, Bae E-J, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee S-J (2009) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13010–13015.
- Desplats P, Spencer B, Coffee E, Patel P, Michael S, Patrick C, Adame A, Rockenstein E, Masliah E (2011) Alpha-synuclein sequesters Dnmt1 from the nucleus: a novel mechanism for epigenetic alterations in Lewy body diseases. *J Biol Chem* 286:9031–9037.
- Dettmer U, Newman AJ, Luth ES, Bartels T, Selkoe D (2013) In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of α -synuclein and β -synuclein in neurons and non-neural cells. *J Biol Chem* 288:6371–6385.
- Diamond A (2013) Executive functions. *Annu Rev Psychol* 64:135–168.
- Doty RL (2012) Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis* 46:527–552.
- Driver-Dunckley E, Adler CH, Hentz JG, Dugger BN, Shill HA, Caviness JN, Sabbagh MN, Beach TG (2014) Olfactory dysfunction in incidental Lewy body disease and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 20:1260–1262.
- Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B (2000) The FAB: a Frontal Assessment Battery at bedside. *Neurology* 55:1621–1626.
- Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55:51–86.
- Dur AL, Lai TL, Stinnakre M-G, Laisné A, Chenais N, Rakotobe S, Passet B, Reine F, Soulier S, Herzog L, Tilly G, Rézai H, Béringue V, Vilotte J-L, Laude H (2017) Divergent prion strain evolution driven by PrP C expression level in transgenic mice. *Nat Commun* 8:1–11.
- Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, Engemann S, Pastore A, Wanker EE (2008) EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 15:558–566.
- Eichenbaum H (2013) What H.M. taught us. *J Cogn Neurosci* 25:14–21.
- Ericsson AC, Crim MJ, Franklin CL (2013) A Brief History of Animal Modeling. *Mo Med* 110:201–205.
- Fagerqvist T, Näsström T, Ihse E, Lindström V, Sahlin C, Tucker SMF, Kasaryan A, Karlsson M, Nikolajeff F, Schell H, Outeiro TF, Kahle PJ, Lannfelt L, Ingelsson M, Bergström J (2013)

- Off-pathway α -synuclein oligomers seem to alter α -synuclein turnover in a cell model but lack seeding capability in vivo. *Amyloid* 20:233–244.
- Fares M-B, Ait-Bouziad N, Dikiy I, Mbefo MK, Jovičić A, Kiely A, Holton JL, Lee S-J, Gitler AD, Eliezer D, Lashuel HA (2014) The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of α -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. *Hum Mol Genet* 23:4491–4509.
- Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang D-S, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D, Langston JW (2004) Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 55:174–179.
- Fathy YY, Jonker AJ, Oudejans E, Jong FJJ de, Dam A-MW van, Rozemuller AJM, Berg WDJ van de (2019) Differential insular cortex subregional vulnerability to α -synuclein pathology in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 45:262–277.
- Fauvet B, Mbefo MK, Fares M-B, Desobry C, Michael S, Ardah MT, Tsika E, Coune P, Prudent M, Lion N, Eliezer D, Moore DJ, Schneider B, Aebischer P, El-Agnaf OM, Masliah E, Lashuel HA (2012) α -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and Escherichia coli Exists Predominantly as Disordered Monomer. *J Biol Chem* 287:15345–15364.
- Ferman TJ, Aoki N, Crook JE, Graff-Radford NR, van Gerpen JA, Uitti RJ, Wszolek ZK, Murray ME, Graff-Radford J, Pedraza O, Kantarci K, Boeve BF, Dickson DW (2018) The limbic and neocortical contribution of α -synuclein, tau and β -amyloid to disease duration in dementia with Lewy bodies. *Alzheimers Dement* 14:330–339.
- Ferman TJ, Smith GE, Boeve BF, Ivnik RJ, Petersen RC, Knopman D, Graff-Radford N, Parisi J, Dickson DW (2004) DLB fluctuations: specific features that reliably differentiate DLB from AD and normal aging. *Neurology* 62:181–187.
- Fink AL (2006) The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Acc Chem Res* 39:628–634.
- Fischer A (2014) Epigenetic memory: the Lamarckian brain. *EMBO J* 33:945–967.
- Fleming SM, Salcedo J, Fernagut P-O, Rockenstein E, Masliah E, Levine MS, Chesselet M-F (2004) Early and Progressive Sensorimotor Anomalies in Mice Overexpressing Wild-Type Human α -Synuclein. *J Neurosci* 24:9434–9440.
- Fleming SM, Salcedo J, Hutson CB, Rockenstein E, Masliah E, Levine MS, Chesselet M-F (2006) Behavioral effects of dopaminergic agonists in transgenic mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Neuroscience* 142:1245–1253.
- Fonseca-Ornelas L, Eisbach SE, Paulat M, Giller K, Fernández CO, Outeiro TF, Becker S, Zweckstetter M (2014) Small molecule-mediated stabilization of vesicle-associated helical α -synuclein inhibits pathogenic misfolding and aggregation. *Nat Commun* 5:1–11.

- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119–130.
- Fredenburg RA, Rospigliosi C, Meray RK, Kessler JC, Lashuel HA, Eliezer D, Lansbury PT (2007) The impact of the E46K mutation on the properties of alpha-synuclein in its monomeric and oligomeric states. *Biochemistry* 46:7107–7118.
- Freichel C, Neumann M, Ballard T, Müller V, Woolley M, Ozmen L, Borroni E, Kretschmar HA, Haass C, Spooren W, Kahle PJ (2007) Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in α -synuclein transgenic mice. *Neurobiology of Aging* 28:1421–1435.
- Frigerio R, Fujishiro H, Ahn T-B, Josephs KA, Maraganore DM, DelleDonne A, Parisi JE, Klos KJ, Boeve BF, Dickson DW, Ahlskog JE (2011) Incidental Lewy body disease: Do some cases represent a preclinical stage of dementia with Lewy bodies? *Neurobiology of Aging* 32:857–863.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002) α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology* 4:160–164.
- Fullard ME, Morley JF, Duda JE (2017) Olfactory Dysfunction as an Early Biomarker in Parkinson's Disease. *Neurosci Bull* 33:515–525.
- Games D, Seubert P, Rockenstein E, Patrick C, Trejo M, Ubhi K, Etle B, Ghassemiam M, Barbour R, Schenk D, Nuber S, Masliah E (2013) Axonopathy in an α -synuclein transgenic model of Lewy body disease is associated with extensive accumulation of C-terminal-truncated α -synuclein. *Am J Pathol* 182:940–953.
- Games D, Valera E, Spencer B, Rockenstein E, Mante M, Adame A, Patrick C, Ubhi K, Nuber S, Sacayon P, Zago W, Seubert P, Barbour R, Schenk D, Masliah E (2014) Reducing C-Terminal-Truncated Alpha-Synuclein by Immunotherapy Attenuates Neurodegeneration and Propagation in Parkinson's Disease-Like Models. *J Neurosci* 34:9441–9454.
- Gaskill BN, Karas AZ, Garner JP, Pritchett-Corning KR (2013) Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *J Vis Exp*:51012.
- Gaspar R, Meisl G, Buell AK, Young L, Kaminski CF, Knowles TPJ, Sparr E, Linse S (2017) Secondary nucleation of monomers on fibril surface dominates α -synuclein aggregation and provides autocatalytic amyloid amplification. *Q Rev Biophys* 50:e6.
- Gehrlach DA, Gaitanos TN, Klein AS, Weiand C, Hennrich AA, Conzelmann K-K, Gogolla N (2020) A whole-brain connectivity map of mouse insular cortex. [bioRxiv:2020.02.10.941518](https://doi.org/10.1101/2020.02.10.941518).
- Geiger JT, Ding J, Crain B, Pletnikova O, Letson C, Dawson TM, Rosenthal LS, Pantelyat A, Gibbs JR, Albert MS, Hernandez DG, Hillis AE, Stone DJ, Singleton AB, North American Brain Expression Consortium, Hardy JA, Troncoso JC, Scholz SW (2016) Next-generation sequencing reveals substantial genetic contribution to dementia with Lewy bodies.

- Neurobiol Dis 94:55–62.
- George JM (2002) The synucleins. *Genome Biol* 3:REVIEWS3002.
- Geser F, Wenning GK, Poewe W, McKeith I (2005) How to diagnose dementia with Lewy bodies: State of the art. *Movement Disorders* 20:S11–S20.
- Ghosh D, Mondal M, Mohite GM, Singh PK, Ranjan P, Anoop A, Ghosh S, Jha NN, Kumar A, Maji SK (2013) The Parkinson's disease-associated H50Q mutation accelerates α -Synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry* 52:6925–6927.
- Ghosh D, Sahay S, Ranjan P, Salot S, Mohite GM, Singh PK, Dwivedi S, Carvalho E, Banerjee R, Kumar A, Maji SK (2014) The newly discovered Parkinson's disease associated Finnish mutation (A53E) attenuates α -synuclein aggregation and membrane binding. *Biochemistry* 53:6419–6421.
- Ghosh D, Singh PK, Sahay S, Jha NN, Jacob RS, Sen S, Kumar A, Riek R, Maji SK (2015) Structure based aggregation studies reveal the presence of helix-rich intermediate during α -Synuclein aggregation. *Sci Rep* 5:1–15.
- Goers J, Manning-Bog AB, McCormack AL, Millett IS, Doniach S, Di Monte DA, Uversky VN, Fink AL (2003) Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry* 42:8465–8471.
- Gogolla N (2017) The insular cortex. *Current Biology* 27:R580–R586.
- Goldberg NRS, Marsh SE, Ochaba J, Shelley BC, Davtayan H, Thompson LM, Steffan JS, Svendsen CN, Blurton-Jones M (2017) Human Neural Progenitor Transplantation Rescues Behavior and Reduces α -Synuclein in a Transgenic Model of Dementia with Lewy Bodies. *Stem Cells Transl Med* 6:1477–1490.
- Goldman JG, Goetz CG, Brandabur M, Sanfilippo M, Stebbins GT (2008) Effects of dopaminergic medications on psychosis and motor function in dementia with Lewy bodies. *Mov Disord* 23:2248–2250.
- Gonçalves S, Outeiro TF (2013) Assessing the Subcellular Dynamics of Alpha-synuclein Using Photoactivation Microscopy. *Mol Neurobiol* 47:1081–1092.
- Goodwin LO, Splinter E, Davis TL, Urban R, He H, Braun RE, Chesler EJ, Kumar V, van Min M, Ndukum J, Philip VM, Reinholdt LG, Svenson K, White JK, Sasner M, Lutz C, Murray SA (2019) Large-scale discovery of mouse transgenic integration sites reveals frequent structural variation and insertional mutagenesis. *Genome Res* 29:494–505.
- Gould N, Mor DE, Lightfoot R, Malkus K, Giasson B, Ischiropoulos H (2014) Evidence of Native α -Synuclein Conformers in the Human Brain. *J Biol Chem* 289:7929–7934.
- Greenbaum EA, Graves CL, Mishizen-Eberz AJ, Lupoli MA, Lynch DR, Englander SW, Axelsen PH, Giasson BI (2005) The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *J Biol Chem* 280:7800–7807.

- Gribaudo S, Tixador P, Bousset L, Fenji A, Lino P, Melki R, Peyrin J-M, Perrier AL (2019) Propagation of α -Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network. *Stem Cell Reports* 12:230–244.
- Grothe MJ, Schuster C, Bauer F, Heinsen H, Prudlo J, Teipel SJ (2014) Atrophy of the cholinergic basal forebrain in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease dementia. *J Neurol* 261:1939–1948.
- Guerreiro R et al. (2018) Investigating the genetic architecture of dementia with Lewy bodies: a two-stage genome-wide association study. *The Lancet Neurology* 17:64–74.
- Guerreiro R et al. (2019) Heritability and genetic variance of dementia with Lewy bodies. *Neurobiology of Disease* 127:492–501.
- Guo JL, Covell DJ, Daniels JP, Iba M, Stieber A, Zhang B, Riddle DM, Kwong LK, Xu Y, Trojanowski JQ, Lee VMY (2013) Distinct α -Synuclein Strains Differentially Promote Tau Inclusions in Neurons. *Cell* 154:103–117.
- Gurry T, Ullman O, Fisher CK, Perovic I, Pochapsky T, Stultz CM (2013) The Dynamic Structure of α -Synuclein Multimers. *J Am Chem Soc* 135:3865–3872.
- Hammond RS, Tull LE, Stackman RW (2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 82:26–34.
- Harding AJ, Broe GA, Halliday GM (2002) Visual hallucinations in Lewy body disease relate to Lewy bodies in the temporal lobe. *Brain* 125:391–403.
- Harding AJ, Halliday GM (2001) Cortical Lewy body pathology in the diagnosis of dementia. *Acta Neuropathol* 102:355–363.
- Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Mann D, Iwatsubo T (2002) Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem* 277:49071–49076.
- Hatami A, Chesselet M-F (2015) Transgenic rodent models to study alpha-synuclein pathogenesis, with a focus on cognitive deficits. *Curr Top Behav Neurosci* 22:303–330.
- Hawkins T, Berman BD (2017) Pimavanserin: A novel therapeutic option for Parkinson disease psychosis. *Neurol Clin Pract* 7:157–162.
- Heidebrink JL (2002) Is dementia with Lewy bodies the second most common cause of dementia? *J Geriatr Psychiatry Neurol* 15:182–187.
- Henstridge CM, Tzioras M, Paolicelli RC (2019) Glial Contribution to Excitatory and Inhibitory Synapse Loss in Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 13 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00063/full#B312>.
- Hershey LA, Coleman-Jackson R (2019) Pharmacological Management of Dementia with Lewy Bodies. *Drugs Aging* 36:309–319.

- Horvath J, Herrmann FR, Burkhard PR, Bouras C, Kövari E (2013) Neuropathology of dementia in a large cohort of patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 19:864–868.
- Hu Q, Ren X, Liu Y, Li Z, Zhang L, Chen X, He C, Chen J-F (2016) Aberrant adenosine A2A receptor signaling contributes to neurodegeneration and cognitive impairments in a mouse model of synucleinopathy. *Experimental Neurology* 283:213–223.
- Huang M, Wang B, Li X, Fu C, Wang C, Kang X (2019) α -Synuclein: A Multifunctional Player in Exocytosis, Endocytosis, and Vesicle Recycling. *Front Neurosci* 13:28.
- Huang Z, Xu Z, Wu Y, Zhou Y (2011) DETERMINING NUCLEAR LOCALIZATION OF ALPHA-SYNUCLEIN IN MOUSE BRAINS. *Neuroscience* 199:318–332.
- Humphries CE, Kohli MA, Nathanson L, Whitehead P, Beecham G, Martin E, Mash DC, Pericak-Vance MA, Gilbert J (2015) Integrated whole transcriptome and DNA methylation analysis identifies gene networks specific to late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 44:977–987.
- Hurtig HI, Trojanowski JQ, Galvin J, Ewbank D, Schmidt ML, Lee VM, Clark CM, Glosser G, Stern MB, Gollomp SM, Arnold SE (2000) Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 54:1916–1921.
- Iacono D, Geraci-Erck M, Rabin ML, Adler CH, Serrano G, Beach TG, Kurlan R (2015) Parkinson disease and incidental Lewy body disease. *Neurology* 85:1670–1679.
- Ibáñez P, Bonnet A-M, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Dürr A, Brice A (2004) Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1169–1171.
- Ikuno M, Yamakado H, Akiyama H, Parajuli LK, Taguchi K, Hara J, Uemura N, Hatanaka Y, Higaki K, Ohno K, Tanaka M, Koike M, Hirabayashi Y, Takahashi R (2019) GBA haploinsufficiency accelerates alpha-synuclein pathology with altered lipid metabolism in a prodromal model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 28:1894–1904.
- Ingelsson M (2016) Alpha-Synuclein Oligomers—Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. *Front Neurosci* 10 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2016.00408/full>.
- Invernizzi G, Papaleo E, Sabate R, Ventura S (2012) Protein aggregation: Mechanisms and functional consequences. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44:1541–1554.
- Irwin DJ, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2013) Parkinson's disease dementia: convergence of α -synuclein, tau and amyloid- β pathologies. *Nature reviews Neuroscience* 14:626.
- Jakes R, Spillantini MG, Goedert M (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Letters* 345:27–32.

- Jarrett JT, Lansbury PT (1993) Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie? *Cell* 73:1055–1058.
- Jellinger KA (2018) Dementia with Lewy bodies and Parkinson’s disease-dementia: current concepts and controversies. *J Neural Transm (Vienna)* 125:615–650.
- Jellinger KA, Attems J (2011) Prevalence and Pathology of Dementia with Lewy Bodies in the Oldest Old: A Comparison with Other Dementing Disorders. *DEM* 31:309–316.
- Jellinger KA, Korczyn AD (2018) Are dementia with Lewy bodies and Parkinson’s disease dementia the same disease? *BMC Med* 16 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5840831/>.
- Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Yang Y, Anantharam V, Kanthasamy AG (2011) α -Synuclein Negatively Regulates Protein Kinase C δ Expression to Suppress Apoptosis in Dopaminergic Neurons by Reducing p300 Histone Acetyltransferase Activity. *J Neurosci* 31:2035–2051.
- Jirkof P (2014) Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods* 234:139–146.
- Jo E, Fuller N, Rand RP, St George-Hyslop P, Fraser PE (2002) Defective membrane interactions of familial Parkinson’s disease mutant A30P alpha-synuclein. *J Mol Biol* 315:799–807.
- Jones SAV, O’Brien JT (2014) The prevalence and incidence of dementia with Lewy bodies: a systematic review of population and clinical studies. *Psychological Medicine* 44:673–683.
- Josselyn SA, Köhler S, Frankland PW (2015) Finding the engram. *Nat Rev Neurosci* 16:521–534.
- Jucker M (2010) The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. *Nat Med* 16:1210–1214.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Müller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, Okochi M, Leimer U, van der Putten H, Probst A, Kremmer E, Kretzschmar HA, Haass C (2000) Subcellular Localization of Wild-Type and Parkinson’s Disease-Associated Mutant α -Synuclein in Human and Transgenic Mouse Brain. *J Neurosci* 20:6365–6373.
- Kane JPM, Surendranathan A, Bentley A, Barker SAH, Taylor J-P, Thomas AJ, Allan LM, McNally RJ, James PW, McKeith IG, Burn DJ, O’Brien JT (2018) Clinical prevalence of Lewy body dementia. *Alzheimers Res Ther* 10 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5815202/>.
- Karampetsou M, Ardah MT, Semitekolou M, Polissidis A, Samiotaki M, Kalomoiri M, Majbour N, Xanthou G, El-Agnaf OMA, Vekrellis K (2017) Phosphorylated exogenous alpha-synuclein fibrils exacerbate pathology and induce neuronal dysfunction in mice. *Scientific Reports* 7:16533.
- Keogh MJ, Kurzawa-Akanbi M, Griffin H, Douroudis K, Ayers KL, Hussein RI, Hudson G, Pyle A,

- Cordell HJ, Attems J, McKeith IG, O'Brien JT, Burn DJ, Morris CM, Thomas AJ, Chinnery PF (2016) Exome sequencing in dementia with Lewy bodies. *Transl Psychiatry* 6:e728.
- Khalaf O, Fauvet B, Oueslati A, Dikiy I, Mahul-Mellier A-L, Ruggeri FS, Mbefo MK, Vercruyse F, Dietler G, Lee S-J, Eliezer D, Lashuel HA (2014) The H50Q mutation enhances α -synuclein aggregation, secretion, and toxicity. *J Biol Chem* 289:21856–21876.
- Kiely AP, Asi YT, Kara E, Limousin P, Ling H, Lewis P, Proukakis C, Quinn N, Lees AJ, Hardy J, Revesz T, Houlden H, Holton JL (2013) α -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol* 125:753–769.
- Kim S, Kwon S-H, Kam T-I, Panicker N, Karuppagounder SS, Lee S, Lee JH, Kim WR, Kook M, Foss CA, Shen C, Lee H, Kulkarni S, Pasricha PJ, Lee G, Pomper MG, Dawson VL, Dawson TM, Ko HS (2019) Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron* 103:627-641.e7.
- Kim TD, Paik SR, Yang CH, Kim J (2000) Structural changes in alpha-synuclein affect its chaperone-like activity in vitro. *Protein Sci* 9:2489–2496.
- Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW (2008) Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14:504–506.
- Kövari E, Gold G, Herrmann FR, Canuto A, Hof PR, Bouras C, Giannakopoulos P (2003) Lewy body densities in the entorhinal and anterior cingulate cortex predict cognitive deficits in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 106:83–88.
- Kropf E, Syan SK, Minuzzi L, Frey BN (2018) From anatomy to function: the role of the somatosensory cortex in emotional regulation. *Braz J Psychiatry* 41:261–269.
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18:106–108.
- Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E (2013) The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci* 14:38–48.
- Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, Lansbury PT (2002) Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol* 322:1089–1102.
- Lee DR, McKeith I, Mosimann U, Ghosh-Nodial A, Grayson L, Wilson B, Thomas AJ (2014) The Dementia Cognitive Fluctuation Scale, a New Psychometric Test for Clinicians to Identify Cognitive Fluctuations in People with Dementia. *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 22:926–935.
- Lee S-J, Jeon H, Kandror KV (2008) Alpha-synuclein is localized in a subpopulation of rat brain synaptic vesicles. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68:509–515.
- Lee Y, Jeon S, Yoo HS, Chung SJ, Lee S-K, Lee PH, Sohn YH, Yun M, Evans AC, Ye BS (2018)

- Amyloid- β -related and unrelated cortical thinning in dementia with Lewy bodies. *Neurobiology of Aging* 72:32–39.
- Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, Candido EPM (1997) Structure-Function Studies on Small Heat Shock Protein Oligomeric Assembly and Interaction with Unfolded Polypeptides. *J Biol Chem* 272:24646–24656.
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honoré A, Rozas N, Pieri L, Madiona K, Dürr A, Melki R, Verny C, Brice A, French Parkinson's Disease Genetics Study Group (2013) G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol* 73:459–471.
- Lewis J, Melrose H, Bumcrot D, Hope A, Zehr C, Lincoln S, Braithwaite A, He Z, Ogholikhan S, Hinkle K, Kent C, Toudjarska I, Charisse K, Braich R, Pandey RK, Heckman M, Maraganore DM, Crook J, Farrer MJ (2008) In vivo silencing of alpha-synuclein using naked siRNA. *Mol Neurodegener* 3:19.
- Li J, Uversky VN, Fink AL (2001) Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry* 40:11604–11613.
- Li J-Y, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehncrona S, Björklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14:501–503.
- Li J-Y, Englund E, Widner H, Rehncrona S, Björklund A, Lindvall O, Brundin P (2010) Characterization of Lewy body pathology in 12- and 16-year-old intrastriatal mesencephalic grafts surviving in a patient with Parkinson's disease. *Movement Disorders* 25:1091–1096.
- Li Y-H, Gao N, Ye Y-W, Li X, Yu S, Yang H, Uéda K, Chan P (2011) Alpha-synuclein functions as a negative regulator for expression of tyrosine hydroxylase. *Acta Neurol Belg* 111:130–135.
- Lim Y, Kehm VM, Lee EB, Soper JH, Li C, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2011) α -Syn Suppression Reverses Synaptic and Memory Defects in a Mouse Model of Dementia with Lewy Bodies. *J Neurosci* 31:10076–10087.
- Lim Y, Kehm VM, Li C, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2010) Forebrain overexpression of alpha-synuclein leads to early postnatal hippocampal neuron loss and synaptic disruption. *Exp Neurol* 221:86–97.
- Lou H, Montoya SE, Alerte TNM, Wang J, Wu J, Peng X, Hong C-S, Friedrich EE, Mader SA, Pedersen CJ, Marcus BS, McCormack AL, Di Monte DA, Daubner SC, Perez RG (2010) Serine 129 phosphorylation reduces the ability of alpha-synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 285:17648–17661.

- Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2012a) Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338:949–953.
- Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VMY (2012b) Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. *Journal of Experimental Medicine* 209:975–986.
- Lutz CM, Osborne MA (2013) Optimizing mouse models of neurodegenerative disorders: are therapeutics in sight? *Future Neurol* 9:67–75.
- Ma K-L, Song L-K, Yuan Y-H, Zhang Y, Yang J-L, Zhu P, Chen N-H (2014) α -Synuclein is Prone to Interaction with the GC-Box-Like Sequence In Vitro. *Cell Mol Neurobiol* 34:603–609.
- Magen I, Chesselet M-F (2010) Chapter 4 - Genetic mouse models of Parkinson's disease: The state of the art. In: *Progress in Brain Research* (Björklund A, Cenci MA, eds), pp 53–87 *Recent Advances in Parkinson's Disease*. Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007961231084004X>.
- Mandler M, Rockenstein E, Overk C, Mante M, Florio J, Adame A, Kim C, Santic R, Schneeberger A, Mattner F, Schmidhuber S, Galabova G, Spencer B, Masliah E, Rissman RA (2019) Effects of single and combined immunotherapy approach targeting amyloid β protein and α -synuclein in a dementia with Lewy bodies-like model. *Alzheimer's & Dementia* Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1552526019300718>.
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8:2804–2815.
- Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 262:23–81.
- Marui W, Iseki E, Nakai T, Miura S, Kato M, Uéda K, Kosaka K (2002) Progression and staging of Lewy pathology in brains from patients with dementia with Lewy bodies. *Journal of the Neurological Sciences* 195:153–159.
- Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games D, Schenk D (2005) Effects of α -Synuclein Immunization in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neuron* 46:857–868.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L (2000) Dopaminergic Loss and Inclusion Body Formation in α -Synuclein Mice: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Science* 287:1265–1269.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Sagara Y, Mallory M, Hashimoto M, Mucke L (2001) β -Amyloid peptides enhance α -synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12245–12250.

- Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DMA, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain* 136:1128–1138.
- Mattila PM, Rinne JO, Helenius H, Dickson DW, R ytt  M, Mattila PM (2000) Alpha-synuclein-immunoreactive cortical Lewy bodies are associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 100:285–290.
- Mbefo MK, Paleologou KE, Boucharaba A, Oueslati A, Schell H, Fournier M, Olschewski D, Yin G, Zweckstetter M, Masliah E, Kahle PJ, Hirling H, Lashuel HA (2010) Phosphorylation of synucleins by members of the Polo-like kinase family. *J Biol Chem* 285:2807–2822.
- McKee RD, Squire LR (1993) On the development of declarative memory. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition* 19:397–404.
- McKeith IG et al. (1996) Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 47:1113–1124.
- McKeith IG et al. (2005) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 65:1863–1872.
- McKeith IG et al. (2017) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology* 89:88–100.
- McKeith IG, Perry EK, Perry RH (1999) Report of the second dementia with Lewy body international workshop: diagnosis and treatment. Consortium on Dementia with Lewy Bodies. *Neurology* 53:902–905.
- McKinney WT, Bunney WE (1969) Animal Model of Depression: I. Review of Evidence: Implications for Research. *Arch Gen Psychiatry* 21:240–248.
- Meeus B, Theuns J, Van Broeckhoven C (2012) The genetics of dementia with lewy bodies: What are we missing? *Arch Neurol* 69:1113–1118.
- Melki R (2015) Role of Different Alpha-Synuclein Strains in Synucleinopathies, Similarities with other Neurodegenerative Diseases. *Journal of Parkinson's Disease* 5:217–227.
- Molano J, Boeve B, Ferman T, Smith G, Parisi J, Dickson D, Knopman D, Graff-Radford N, Geda Y, Lucas J, Kantarci K, Shiung M, Jack C, Silber M, Pankratz VS, Petersen R (2010) Mild cognitive impairment associated with limbic and neocortical lewy body disease: a clinicopathological study. *Brain* 133:540–556.
- Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Vinters HV, Hyman BT (2012) National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol* 123:1–11.
- Moraga-Amaro R, Cort s-Rojas A, Simon F, Stehberg J (2014) Role of the insular cortex in taste

- familiarity. *Neurobiol Learn Mem* 109:37–45.
- Morris M, Sanchez PE, Verret L, Beagle AJ, Guo W, Dubal D, Ranasinghe KG, Koyama A, Ho K, Yu G-Q, Vossel KA, Mucke L (2015) Network dysfunction in α -synuclein transgenic mice and human Lewy body dementia. *Ann Clin Transl Neurol* 2:1012–1028.
- Mougenot A-L, Nicot S, Bencsik A, Morignat E, Verchère J, Lakhdar L, Legastelois S, Baron T (2012) Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Aging* 33:2225–2228.
- Mueller C, Ballard C, Corbett A, Aarsland D (2017) The prognosis of dementia with Lewy bodies. *The Lancet Neurology* 16:390–398.
- Mukaetova-Ladinska EB, Andras A, Milne J, Abdel-All Z, Borr I, Jaros E, Perry RH, Honer WG, Cleghorn A, Doherty J, McIntosh G, Perry EK, Kalaria RN, McKeith IG (2013) Synaptic proteins and choline acetyltransferase loss in visual cortex in dementia with Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:53–60.
- Muntané G, Ferrer I, Martínez-Vicente M (2012) α -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. *Neuroscience* 200:106–119.
- Murata M, Odawara T, Hasegawa K, Kajiwara R, Takeuchi H, Tagawa M, Kosaka K (2019) Effect of zonisamide on parkinsonism in patients with dementia with Lewy bodies: A phase 3 randomized clinical trial. *Parkinsonism & Related Disorders* Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1353802019305243>.
- Nadel L, Moscovitch M (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology* 7:217–227.
- Nalls MA et al. (2013) A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. *JAMA Neurol* 70:727–735.
- Namkung H, Kim S-H, Sawa A (2017a) The insula: an underestimated brain area in clinical neuroscience, psychiatry, and neurology. *Trends Neurosci* 40:200–207.
- Namkung H, Kim S-H, Sawa A (2017b) The Insula: An Underestimated Brain Area in Clinical Neuroscience, Psychiatry, and Neurology. *Trends Neurosci* 40:200–207.
- Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH (2010) Increased Expression of Alpha-Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering After Endocytosis. *Neuron* 65:66–79.
- Neumann M, Kahle PJ, Giasson BI, Ozmen L, Borroni E, Spooren W, Müller V, Odoy S, Fujiwara H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Trojanowski JQ, Kretschmar HA, Haass C (2002) Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies. *J Clin Invest* 110:1429–1439.
- Nouraei N, Mason DM, Miner KM, Carcella MA, Bhatia TN, Dumm BK, Soni D, Johnson DA, Luk KC, Leak RK (2018) Critical appraisal of pathology transmission in the α -synuclein fibril

- model of Lewy body disorders. *Experimental Neurology* 299:172–196.
- Nyberg L, McIntosh AR, Cabeza R, Habib R, Houle S, Tulving E (1996) General and specific brain regions involved in encoding and retrieval of events: what, where, and when. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11280–11285.
- Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T, Meijer L, Kahle PJ, Haass C (2000) Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem* 275:390–397.
- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KSP (2004) Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol* 3:496–503.
- Osterberg VR, Spinelli KJ, Weston LJ, Luk KC, Woltjer RL, Unni VK (2015) Progressive Aggregation of Alpha-Synuclein and Selective Degeneration of Lewy Inclusion-Bearing Neurons in a Mouse Model of Parkinsonism. *Cell Reports* 10:1252–1260.
- Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B (1999) α -Synuclein Shares Physical and Functional Homology with 14-3-3 Proteins. *J Neurosci* 19:5782–5791.
- Ottolini D, Calí T, Szabò I, Brini M (2017) Alpha-synuclein at the intracellular and the extracellular side: functional and dysfunctional implications. *Biol Chem* 398:77–100.
- Oueslati A (2016) Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *J Parkinsons Dis* 6:39–51.6/22/20 12:20:00 PM
- Oueslati A, Fournier M, Lashuel HA (2010) Chapter 7 - Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of α -synuclein: Implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. In: *Progress in Brain Research* (Björklund A, Cenci MA, eds), pp 115–145 *Recent Advances in Parkinson's Disease: Basic Research*. Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612310830079>.
- Oueslati A, Schneider BL, Aebischer P, Lashuel HA (2013) Polo-like kinase 2 regulates selective autophagic α -synuclein clearance and suppresses its toxicity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E3945-3954.
- Outeiro TF, Koss DJ, Erskine D, Walker L, Kurzawa-Akanbi M, Burn D, Donaghy P, Morris C, Taylor J-P, Thomas A, Attems J, McKeith I (2019) Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Molecular Neurodegeneration* 14:5.
- Overk CR, Cartier A, Shaked G, Rockenstein E, Ubhi K, Spencer B, Price DL, Patrick C, Desplats P, Masliah E (2014) Hippocampal neuronal cells that accumulate α -synuclein fragments are more vulnerable to A β oligomer toxicity via mGluR5 – implications for dementia with Lewy bodies. *Molecular Neurodegeneration* 9:18.
- Pagan FL, Hebron ML, Wilmarth B, Torres-Yaghi Y, Lawler A, Mundel EE, Yusuf N, Starr NJ,

- Arellano J, Howard HH, Peyton M, Matar S, Liu X, Fowler AJ, Schwartz SL, Ahn J, Moussa C (2019) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single dose Nilotinib in individuals with Parkinson's disease. *Pharmacol Res Perspect* 7:e00470.
- Paleologou KE, Oueslati A, Shakked G, Rospigliosi CC, Kim H-Y, Lamberto GR, Fernandez CO, Schmid A, Chegini F, Gai WP, Chiappe D, Moniatte M, Schneider BL, Aebischer P, Eliezer D, Zweckstetter M, Masliah E, Lashuel HA (2010) Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *J Neurosci* 30:3184–3198.
- Paleologou KE, Schmid AW, Rospigliosi CC, Kim H-Y, Lamberto GR, Fredenburg RA, Lansbury PT, Fernandez CO, Eliezer D, Zweckstetter M, Lashuel HA (2008) Phosphorylation at Ser-129 but Not the Phosphomimics S129E/D Inhibits the Fibrillation of α -Synuclein. *J Biol Chem* 283:16895–16905.
- Park HJ, Rajbhandari I, Yang HS, Lee S, Cucoranu D, Cooper DS, Klein JD, Sands JM, Choi I (2010) Neuronal expression of sodium/bicarbonate cotransporter NBCn1 (SLC4A7) and its response to chronic metabolic acidosis. *Am J Physiol, Cell Physiol* 298:C1018-1028.
- Park SM, Jung HY, Kim TD, Park JH, Yang C-H, Kim J (2002) Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *J Biol Chem* 277:28512–28520.
- Parkkinen L, Kauppinen T, Pirttilä T, Autere JM, Alafuzoff I (2005) Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. *Ann Neurol* 57:82–91.
- Pasanen P, Myllykangas L, Siitonen M, Raunio A, Kaakkola S, Lytinen J, Tienari PJ, Pöyhönen M, Paetau A (2014) Novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging* 35:2180.e1-5.
- Peelaerts W, Bousset L, Baekelandt V, Melki R (2018) α -Synuclein strains and seeding in Parkinson's disease, incidental Lewy body disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy: similarities and differences. *Cell Tissue Res* 373:195–212.
- Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, Van den Haute C, Melki R, Baekelandt V (2015) α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522:340–344.
- Peng C, Gathagan RJ, Covell DJ, Medellin C, Stieber A, Robinson JL, Zhang B, Pitkin RM, Olufemi MF, Luk KC, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2018) Cellular Milieu Imparts Distinct Pathological α -Synuclein Strains in α -Synucleinopathies. *Nature* 557:558–563.
- Peng X, Peng XM, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG (2005) Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci* 118:3523–3530.
- Perez F, Helmer C, Dartigues JF, Auriacombe S, Tison F (2010) A 15-year population-based cohort study of the incidence of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies

- in an elderly French cohort. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 81:742–746.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ (2002) A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 22:3090–3099.
- Philippi N, Noblet V, Duron E, Cretin B, Bouilly C, Wisniewski I, Seux ML, Martin-Hunyadi C, Chaussade E, Demuyneck C, Kremer S, Lehericy S, Gounot D, Armspach JP, Hanon O, Blanc F (2016) Exploring anterograde memory: a volumetric MRI study in patients with mild cognitive impairment. *Alz Res Therapy* 8:1–14.
- Pinho R et al. (2019) Nuclear localization and phosphorylation modulate pathological effects of alpha-synuclein. *Hum Mol Genet* 28:31–50.
- Polymeropoulos MH et al. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045–2047.
- Potashkin JA, Blume SR, Runkle NK (2010) Limitations of Animal Models of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2011 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3010694/>.
- Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL, Houlden H, Schapira AH (2013) A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 80:1062–1064.
- Radivojac P, Iakoucheva LM, Oldfield CJ, Obradovic Z, Uversky VN, Dunker AK (2007) Intrinsic disorder and functional proteomics. *Biophys J* 92:1439–1456.
- Recasens A, Dehay B (2014) Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy* 8 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/pmc/articles/PMC4270285/>.
- Recasens A, Dehay B, Bové J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Pérez-Villalba A, Fernagut P-O, Blesa J, Parent A, Perier C, Fariñas I, Obeso JA, Bezard E, Vila M (2014) Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Annals of Neurology* 75:351–362.
- Recasens A, Ulusoy A, Kahle PJ, Di Monte DA, Dehay B (2018) In vivo models of alpha-synuclein transmission and propagation. *Cell Tissue Res* 373:183–193.
- Rey NL, Bousset L, George S, Madaj Z, Meyerdirk L, Schulz E, Steiner JA, Melki R, Brundin P (2019) α -Synuclein conformational strains spread, seed and target neuronal cells differentially after injection into the olfactory bulb. *Acta Neuropathologica Communications* 7:221.
- Rey NL, George S, Steiner JA, Madaj Z, Luk KC, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Brundin P (2018) Spread of aggregates after olfactory bulb injection of α -synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. *Acta Neuropathol* 135:65–83.
- Rey NL, Petit GH, Bousset L, Melki R, Brundin P (2013) Transfer of human α -synuclein from the

- olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathol* 126:555–573.
- Rey NL, Steiner JA, Maroof N, Luk KC, Madaj Z, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Brundin P (2016) Widespread transneuronal propagation of α -synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *J Exp Med* 213:1759–1778.
- Rich JB (2011) Remote Memory. In: *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology* (Kreutzer JS, DeLuca J, Caplan B, eds), pp 2154–2155. New York, NY: Springer New York. Available at: https://doi.org/10.1007/978-0-387-79948-3_1149.
- Richardson DS, Lichtman JW (2015) Clarifying Tissue Clearing. *Cell* 162:246–257.
- Rieker C, Dev KK, Lehnhoff K, Barbieri S, Ksiazek I, Kauffmann S, Danner S, Schell H, Boden C, Ruegg MA, Kahle PJ, van der Putten H, Shimshek DR (2011) Neuropathology in mice expressing mouse alpha-synuclein. *PLoS ONE* 6:e24834.
- Rizzo G, Arcuti S, Copetti M, Alessandria M, Savica R, Fontana A, Liguori R, Logroscino G (2018) Accuracy of clinical diagnosis of dementia with Lewy bodies: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89:358–366.
- Roberts HL, Brown DR (2015) Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein. *Biomolecules* 5:282–305.
- Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, Masliah E (2002) Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res* 68:568–578.
- Rockenstein E, Nuber S, Overk CR, Ubhi K, Mante M, Patrick C, Adame A, Trejo-Morales M, Gerez J, Picotti P, Jensen PH, Campioni S, Riek R, Winkler J, Gage FH, Winner B, Masliah E (2014) Accumulation of oligomer-prone α -synuclein exacerbates synaptic and neuronal degeneration in vivo. *Brain* 137:1496–1513.
- Rodriguez JA et al. (2015) Structure of the toxic core of α -synuclein from invisible crystals. *Nature* 525:486–490.
- Roquet D, Noblet V, Anthony P, Philippi N, Demuynck C, Cretin B, Martin-Hunyadi C, Sousa PL de, Blanc F (2017) Insular atrophy at the prodromal stage of dementia with Lewy bodies: a VBM DARTEL study. *Scientific Reports* 7:9437.
- Rosenzweig MR (1998) Proceedings of the 6th conference on the neurobiology of learning and memory. *Brain and memory: from genes to behavior. Some historical background of topics in this conference. Neurobiol Learn Mem* 70:3–13.
- Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, Kachergus J, Hulihan MM, Middleton FA, Nishioka K, Fuchs J, Gasser T, Maraganore DM, Adler CH, Larvor L, Chartier-Harlin M-C, Nilsson C, Langston JW, Gwinn K, Hattori N, Farrer MJ (2008) Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann Neurol* 63:743–750.

- Rota L, Pellegrini C, Benvenuti L, Antonioli L, Fornai M, Blandizzi C, Cattaneo A, Colla E (2019) Constipation, deficit in colon contractions and alpha-synuclein inclusions within the colon precede motor abnormalities and neurodegeneration in the central nervous system in a mouse model of alpha-synucleinopathy. *Translational Neurodegeneration* 8:5.
- Rutherford NJ, Giasson BI (2015) The A53E α -synuclein pathological mutation demonstrates reduced aggregation propensity in vitro and in cell culture. *Neurosci Lett* 597:43–48.
- Rutherford NJ, Moore BD, Golde TE, Giasson BI (2014) Divergent effects of the H50Q and G51D SNCA mutations on the aggregation of α -synuclein. *J Neurochem* 131:859–867.
- Sacino AN, Brooks M, McGarvey NH, McKinney AB, Thomas MA, Levites Y, Ran Y, Golde TE, Giasson BI (2013) Induction of CNS α -synuclein pathology by fibrillar and non-amyloidogenic recombinant α -synuclein. *Acta Neuropathol Commun* 1:38.
- Sacino AN, Brooks M, McKinney AB, Thomas MA, Shaw G, Golde TE, Giasson BI (2014) Brain injection of α -synuclein induces multiple proteinopathies, gliosis, and a neuronal injury marker. *J Neurosci* 34:12368–12378.
- Santpere G, Garcia-Esparcia P, Andres-Benito P, Lorente-Galdos B, Navarro A, Ferrer I (2018) Transcriptional network analysis in frontal cortex in Lewy body diseases with focus on dementia with Lewy bodies. *Brain Pathol* 28:315–333.
- Savica R, Grossardt BR, Bower JH, Boeve BF, Ahlskog JE, Rocca WA (2013) Incidence of Dementia with Lewy Bodies and Parkinson's Disease Dementia. *JAMA Neurol* 70:1396–1402.
- Schell H, Hasegawa T, Neumann M, Kahle PJ (2009) Nuclear and neuritic distribution of serine-129 phosphorylated α -synuclein in transgenic mice. *Neuroscience* 160:796–804.
- Schneider JA, Arvanitakis Z, Yu L, Boyle PA, Leurgans SE, Bennett DA (2012) Cognitive impairment, decline and fluctuations in older community-dwelling subjects with Lewy bodies. *Brain* 135:3005–3014.
- Schulz-Schaeffer WJ (2010) The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol* 120:131–143.
- Scott D, Roy S (2012) α -Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis. *J Neurosci* 32:10129–10135.
- Scott DA, Tabarean I, Tang Y, Cartier A, Masliah E, Roy S (2010) A Pathologic Cascade Leading to Synaptic Dysfunction in α -Synuclein-Induced Neurodegeneration. *J Neurosci* 30:8083–8095.
- Semon R (1906) Die Mneme als erhaltendes Prinzip im Wechsel des organischen Geschehens. *Nature* 73:338–338.
- Singleton AB et al. (2003) α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science*

302:841–841.

- Smith WW, Margolis RL, Li X, Troncoso JC, Lee MK, Dawson VL, Dawson TM, Iwatsubo T, Ross CA (2005) α -Synuclein Phosphorylation Enhances Eosinophilic Cytoplasmic Inclusion Formation in SH-SY5Y Cells. *J Neurosci* 25:5544–5552.
- Sorrentino ZA, Brooks MMT, Hudson V, Rutherford NJ, Golde TE, Giasson BI, Chakrabarty P (2017) Intrastriatal injection of α -synuclein can lead to widespread synucleinopathy independent of neuroanatomic connectivity. *Mol Neurodegener* 12 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5447308/>.
- Soto C, Pritzkow S (2018) Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 21:1332–1340.
- Souza JM, Giasson BI, Lee VM-Y, Ischiropoulos H (2000) Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Letters* 474:116–119.
- Spillantini MG, Divane A, Goedert M (1995) Assignment of Human α -Synuclein (SNCA) and β -Synuclein (SNCB) Genes to Chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics* 27:379–381.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839–840.
- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory* 82:171–177.
- Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology* 5:169–177.
- Squire LR, Knowlton B, Musen G (1993) The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol* 44:453–495.
- Stinton C, McKeith I, Taylor J-P, Lafortune L, Mioshi E, Mak E, Cambridge V, Mason J, Thomas A, O'Brien JT (2015) Pharmacological Management of Lewy Body Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Psychiatry* 172:731–742.
- Stoyka LE, Arrant AE, Thrasher DR, Russell DL, Freire J, Mahoney CL, Narayanan A, Dib AG, Standaert DG, Volpicelli-Daley LA (2019) Behavioral defects associated with amygdala and cortical dysfunction in mice with seeded α -synuclein inclusions. *Neurobiol Dis* 134:104708.
- Sugeno N, Takeda A, Hasegawa T, Kobayashi M, Kikuchi A, Mori F, Wakabayashi K, Itoyama Y (2008) Serine 129 phosphorylation of alpha-synuclein induces unfolded protein response-mediated cell death. *J Biol Chem* 283:23179–23188.
- Swank MW, Sweatt JD (2001) Increased Histone Acetyltransferase and Lysine Acetyltransferase Activity and Biphasic Activation of the ERK/RSK Cascade in Insular Cortex During Novel Taste Learning. *J Neurosci* 21:3383–3391.
- Sweers K, van der Werf K, Bennink M, Subramaniam V (2011) Nanomechanical properties of

- α -synuclein amyloid fibrils: a comparative study by nanoindentation, harmonic force microscopy, and Peakforce QNM. *Nanoscale Res Lett* 6:270.
- Sweers KKM, van der Werf KO, Bennink ML, Subramaniam V (2012) Atomic force microscopy under controlled conditions reveals structure of C-terminal region of α -synuclein in amyloid fibrils. *ACS Nano* 6:5952–5960.
- Tanaka M, Kim YM, Lee G, Junn E, Iwatsubo T, Mouradian MM (2004) Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J Biol Chem* 279:4625–4631.
- Tanji K, Mori F, Mimura J, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (2010) Proteinase K-resistant alpha-synuclein is deposited in presynapses in human Lewy body disease and A53T alpha-synuclein transgenic mice. *Acta Neuropathol* 120:145–154.
- Tarakad A, Jankovic J (2017) Chapter Seventeen - Anosmia and Ageusia in Parkinson's Disease. In: *International Review of Neurobiology* (Chaudhuri KR, Titova N, eds), pp 541–556 *Nonmotor Parkinson's: The Hidden Face*. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074774217300855>.
- Thakur P, Breger LS, Lundblad M, Wan OW, Mattsson B, Luk KC, Lee VMY, Trojanowski JQ, Björklund A (2017) Modeling Parkinson's disease pathology by combination of fibril seeds and α -synuclein overexpression in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E8284–E8293.
- Thompson RF (2005) In Search of Memory Traces. *Annual Review of Psychology* 56:1–23.
- Tonegawa S, Morrissey MD, Kitamura T (2018) The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat Rev Neurosci* 19:485–498.
- Tonegawa S, Pignatelli M, Roy DS, Ryan TJ (2015) Memory engram storage and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology* 35:101–109.
- Tran HT, Chung CH-Y, Iba M, Zhang B, Trojanowski JQ, Luk KC, Lee VMY (2014) α -Synuclein Immunotherapy Blocks Uptake and Templated Propagation of Misfolded α -Synuclein and Neurodegeneration. *Cell Reports* 7:2054–2065.
- Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, Shaked GM, Sharikov Y, Mizuno H, Spencer B, Rockenstein E, Trejo M, Platoshyn O, Yuan JX-J, Masliah E (2008) Mechanisms of Hybrid Oligomer Formation in the Pathogenesis of Combined Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *PLOS ONE* 3:e3135.
- Tsigelny IF, Sharikov Y, Kouznetsova VL, Greenberg JP, Wrasidlo W, Overk C, Gonzalez T, Trejo M, Spencer B, Kosberg K, Masliah E (2015) Molecular determinants of α -synuclein mutants' oligomerization and membrane interactions. *ACS Chem Neurosci* 6:403–416.
- Tsuang D et al. (2013) APOE ϵ 4 Increases Risk for Dementia in Pure Synucleinopathies. *JAMA Neurol* 70:223–228.
- Tsuang DW, DiGiacomo L, Bird TD (2004) Familial Occurrence of Dementia With Lewy Bodies.

- Am J Geriatr Psychiatry 12:179–188.
- Tulving E (1972) Episodic and semantic memory. In: Organization of memory, pp xiii, 423–xiii, 423. Oxford, England: Academic Press.
- Tulving E (2002) Episodic Memory: From Mind to Brain. Annual Review of Psychology 53:1–25.
- Uéda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA 90:11282–11286.
- Uehara T, Choong C-J, Nakamori M, Hayakawa H, Nishiyama K, Kasahara Y, Baba K, Nagata T, Yokota T, Tsuda H, Obika S, Mochizuki H (2019) Amido-bridged nucleic acid (AmNA)-modified antisense oligonucleotides targeting α -synuclein as a novel therapy for Parkinson's disease. Sci Rep 9:1–13.
- Uversky VN (2003) A Protein-Chameleon: Conformational Plasticity of α -Synuclein, a Disordered Protein Involved in Neurodegenerative Disorders. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 21:211–234.
- Uversky VN, Li J, Fink AL (2001) Evidence for a Partially Folded Intermediate in α -Synuclein Fibril Formation. J Biol Chem 276:10737–10744.
- van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WP, Ruegg MA, Lin S, Caroni P, Sommer B, Tolnay M, Bilbe G (2000) Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. J Neurosci 20:6021–6029.
- van Raaij ME, van Gestel J, Segers-Nolten IMJ, de Leeuw SW, Subramaniam V (2008) Concentration dependence of alpha-synuclein fibril length assessed by quantitative atomic force microscopy and statistical-mechanical theory. Biophys J 95:4871–4878.
- Varga OE, Hansen AK, Sandøe P, Olsson IAS (2010) Validating animal models for preclinical research: a scientific and ethical discussion. Altern Lab Anim 38:245–248.
- Vergouw LJM, Bosman B, van de Beek M, Salomé M, Hoogers SE, van Steenoven I, Roks G, Bonifati V, van Swieten JC, Lemstra AW, de Jong FJ (2019) Family History Is Associated with Phenotype in Dementia with Lewy Bodies. J Alzheimers Dis.
- Vergouw LJM, Steenoven I van, Berg WDJ van de, Teunissen CE, Swieten JC van, Bonifati V, Lemstra AW, Jong FJ de (2017) An update on the genetics of dementia with Lewy bodies. Parkinsonism & Related Disorders 43:1–8.
- Villar-Piqué A, Fonseca TL da, Outeiro TF (2016) Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. Journal of Neurochemistry 139:240–255.
- Volpicelli-Daley LA, Kirik D, Stoyka LE, Standaert DG, Harms AS (2016) How can rAAV- α -synuclein and the fibril α -synuclein models advance our understanding of Parkinson's disease? J Neurochem 139:131–155.

- Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H (2007) The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology* 27:494–506.
- Wales P, Pinho R, Lázaro DF, Outeiro TF (2013) Limelight on alpha-synuclein: pathological and mechanistic implications in neurodegeneration. *J Parkinsons Dis* 3:415–459.
- Walker MP, Ayre GA, Cummings JL, Wesnes K, McKeith IG, O'Brien JT, Ballard CG (2000) The Clinician Assessment of Fluctuation and the One Day Fluctuation Assessment Scale: Two methods to assess fluctuating confusion in dementia. *The British Journal of Psychiatry* 177:252–256.
- Wang G-F, Li C, Pielak GJ (2010) 19F NMR studies of α -synuclein-membrane interactions. *Protein Sci* 19:1686–1691.
- Wang H-F, Yu J-T, Tang S-W, Jiang T, Tan C-C, Meng X-F, Wang C, Tan M-S, Tan L (2015) Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors and memantine in cognitive impairment in Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia, and dementia with Lewy bodies: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86:135–143.
- Wang Q, Zhang Z, Li L, Wen H, Xu Q (2014) Assessment of cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: prevalence and risk factors. *Clin Interv Aging* 9:275–281.
- Wang W et al. (2011) A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *PNAS* 108:17797–17802.
- Watts JC, Giles K, Oehler A, Middleton L, Dexter DT, Gentleman SM, DeArmond SJ, Prusiner SB (2013) Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:19555–19560.
- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35:13709–13715.
- Wersinger C, Sidhu A (2003) Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci Lett* 340:189–192.
- Westphal CH, Chandra SS (2013) Monomeric Synucleins Generate Membrane Curvature. *J Biol Chem* 288:1829–1840.
- Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C (2008) The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *The EMBO Journal* 27:336–349.
- Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E, Gage FH, Riek R (2011) In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:4194–4199.
- Wong YC, Krainc D (2017) α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and

- therapeutic strategies. *Nat Med* 23:1–13.
- Wu L-G, Hamid E, Shin W, Chiang H-C (2014) Exocytosis and Endocytosis: Modes, Functions, and Coupling Mechanisms. *Annu Rev Physiol* 76:301–331.
- Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L (2013) Alpha-synuclein and Protein Degradation Systems: a Reciprocal Relationship. *Mol Neurobiol* 47:537–551.
- Xu J, Wu X-S, Sheng J, Zhang Z, Yue H-Y, Sun L, Sgobio C, Lin X, Peng S, Jin Y, Gan L, Cai H, Wu L-G (2016) α -Synuclein Mutation Inhibits Endocytosis at Mammalian Central Nerve Terminals. *J Neurosci* 36:4408–4414.
- Yamaguchi K, Cochran EJ, Murrell JR, Polymeropoulos MH, Shannon KM, Crowther RA, Goedert M, Ghetti B (2005) Abundant neuritic inclusions and microvacuolar changes in a case of diffuse Lewy body disease with the A53T mutation in the alpha-synuclein gene. *Acta Neuropathol* 110:298–305.
- Yamamoto R, Iseki E, Marui W, Togo T, Katsuse O, Kato M, Isojima D, Akatsu H, Kosaka K, Arai H (2005) Non-uniformity in the regional pattern of Lewy pathology in brains of dementia with Lewy bodies. *Neuropathology* 25:188–194.
- Yang M, Crawley JN (2009) Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Curr Protoc Neurosci* CHAPTER:Unit-8.24.
- Yiannakas A, Rosenblum K (2017) The Insula and Taste Learning. *Front Mol Neurosci* 10 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00335/full>.
- Yoon JH, Kim M, Moon SY, Yong SW, Hong JM (2015) Olfactory function and neuropsychological profile to differentiate dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: A 5-year follow-up study. *Journal of the Neurological Sciences* 355:174–179.
- Yu S, Li X, Liu G, Han J, Zhang C, Li Y, Xu S, Liu C, Gao Y, Yang H, Uéda K, Chan P (2007) Extensive nuclear localization of α -synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience* 145:539–555.
- Yu S, Zuo X, Li Y, Zhang C, Zhou M, Zhang YA, Uéda K, Chan P (2004) Inhibition of tyrosine hydroxylase expression in alpha-synuclein-transfected dopaminergic neuronal cells. *Neurosci Lett* 367:34–39.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Tortosa EG, Ser T del, Muñoz DG, Yebenes JG de (2004) The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology* 55:164–173.
- Zhang J, Li X, Li J-D (2019) The Roles of Post-translational Modifications on α -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Diseases. *Front Neurosci* 13 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00381/full>
- Zhang L, Zhang C, Zhu Y, Cai Q, Chan P, Uéda K, Yu S, Yang H (2008) Semi-quantitative analysis

of alpha-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain Res* 1244:40–52.

Zhou W, Milder JB, Freed CR (2008) Transgenic Mice Overexpressing Tyrosine-to-Cysteine Mutant Human α -Synuclein A PROGRESSIVE NEURODEGENERATIVE MODEL OF DIFFUSE LEWY BODY DISEASE. *J Biol Chem* 283:9863–9870.

Zupancic M, Mahajan A, Handa K (2011) Dementia With Lewy Bodies: Diagnosis and Management for Primary Care Providers. *Prim Care Companion CNS Disord* 13 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267516/>.

Développement et caractérisation de nouveaux modèles murins de maladie à corps de Lewy

Résumé

La maladie à corps de Lewy (MCL) est la seconde maladie cognitive neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer (MA). Les patients développent des troubles cognitifs similaires à ceux de la MA, et des caractéristiques du syndrome parkinsonien. Au niveau neuropathologique, les patients présentent des agrégats d' α -synucléine (α -syn), appelés corps de Lewy (CL), que l'on retrouve aussi dans la maladie de Parkinson (MP). En début de pathologie, ces agrégats sont diffus dans l'ensemble du cerveau des patients MCL, alors qu'ils sont davantage localisés dans le tronc cérébral et la substance noire dans la MP. Basé sur le fait que certaines formes familiales de MP présentent une mutation ou une surexpression du gène SNCA de l' α -syn, des modèles animaux centrés sur l' α -syn ont été générés, notamment en la surexprimant, ou en injectant des fibrilles d' α -syn dans des régions spécifiques. Cependant peu de modèles ont été sélectionnés pour mimer la MCL. L'objectif de ce projet de thèse est de développer et caractériser des modèles murins pertinents de MCL. Nous avons commencé par phénotyper un modèle surexprimant l' α -syn humaine ($h\alpha$ -syn) dans les neurones matures (modèle SNCA). Ces souris présentent une atteinte essentiellement frontale aux niveaux comportemental et anatomopathologique, qui semble correspondre à ce qui est observé au stade prodromal de la MCL. En se basant sur des observations cliniques récentes montrant une altération précoce du cortex insulaire antérieur (CI ant) des patients MCL, nous avons tenté d'amplifier les symptômes des souris SNCA en leur injectant des fibrilles d' $h\alpha$ -syn dans le CI ant. Le phénotype comportemental des souris SNCA n'a pas été aggravé, mais nous avons observé une propagation diffuse de la pathologie α -syn dans les régions connectées au CI ant 9 mois post-injection.

Mots clés : Maladie à corps de Lewy, α -synucléine, fibrilles, cortex insulaire, modèle murin, caractérisation comportementale et anatomopathologique

Summary

Dementia with Lewy bodies (DLB) is the second dementia after Alzheimer's disease (AD). DLB patients develop cognitive deficits as in AD, and one or more features of parkinsonism. At the neuropathological level, patients show α -syn aggregates called Lewy bodies which are also characteristic in Parkinson's disease (PD). At DLB onset, the aggregates are diffuse in the whole brain, whereas at PD onset they are more restricted to the brainstem and the substantia nigra. Since some familial forms of PD exhibit α -syn mutations or overexpression, many animal models have been made either by overexpressing α -syn or by injecting α -syn fibrils in the specifically altered areas. However, only a few models have been selected to mimic DLB. This PhD project aims to generate and characterize new relevant DLB models. We have started by phenotyping a mouse model overexpressing the human α -syn in neurons (SNCA model). We show that the mice develop behavioral and neuropathological frontal impairments, which seem to match the prodromal stage of DLB in humans. Based on observations made on the human pathology showing early anterior insular cortex alteration in DLB patients, we aimed to amplify SNCA mice symptoms by targeting this region with injection of α -syn pathological fibrils. SNCA mice did not show any worsening of the behavioral phenotype. However, we observed a great propagation of the α -syn pathology throughout insular cortex interconnected regions.

Keywords : Dementia with Lewy bodies, α -synuclein, fibrils, insular cortex, mouse model, behavioral and anatomopathological characterization