



**HAL**  
open science

**Recherche de biomarqueur des phases précoces de la  
maladie de Parkinson pour le diagnostic et la  
compréhension des mécanismes physiopathologiques :  
Etude translationnelle de l'animal à l'homme**

David Mallet

► **To cite this version:**

David Mallet. Recherche de biomarqueur des phases précoces de la maladie de Parkinson pour le diagnostic et la compréhension des mécanismes physiopathologiques : Etude translationnelle de l'animal à l'homme. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV024 . tel-03720794

**HAL Id: tel-03720794**

**<https://theses.hal.science/tel-03720794v1>**

Submitted on 12 Jul 2022

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

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



## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Neurosciences - Neurobiologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**David MALLET**

Thèse dirigée par **Florence FAUVELLE** et codirigée par **Sabrina BOULET**

préparée au sein du **Laboratoire Grenoble Institut des Neurosciences**  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

**Recherche de biomarqueur des phases précoces de la maladie de parkinson pour le diagnostic et la compréhension des mécanismes physiopathologiques : Étude translationnelle de l'animal à l'homme**

**Biomarker research in the early stages of Parkinson's disease for the diagnosis and understanding of pathophysiological mechanisms: A translational study from animals to humans**

Thèse soutenue publiquement le **21 mars 2022**,  
devant le jury composé de :

**Madame Florence FAUVELLE**

INGENIEUR DE RECHERCHE, INSERM, Co-directrice de thèse

**Madame Sabrina BOULET**

MAITRE DE CONFERENCE, UGA, Co-directrice de thèse

**Monsieur Wassilios MEISSNER**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,  
Université de Bordeaux, Rapporteur

**Monsieur Patrick EMOND**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,  
Université de Tours, Rapporteur

**Monsieur Maxime CAZORLA**

CHARGE DE RECHERCHE, INSERM, Examinateur

**Madame Bénédicte ELENA-HERRMANN**

CHARGE DE RECHERCHE, CNRS, Examinatrice

**Madame Hélène BLASCO**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,  
Université de Tours, Examinatrice

**Monsieur Alain BUISSON**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UGA, Examinateur



# Remerciements



Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier le **Pr. Alain Buisson** d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Habitué du poste il ne fait aucun doute que tu seras presque aussi à l'aise que sur un terrain de soccer.

Je souhaiterais remercier les **Pr. Wassilios Meissner** et **Patrick Emond** d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Merci pour votre relecture et évaluation de ce travail.

J'aimerais également remercier les **Dr. Helene Blasco, Bénédicte Elena-Hermann, Maxime Cazorla** d'avoir accepté d'examiner ce travail. Merci à Bénédicte et Maxime d'avoir suivi l'évolution de mes travaux et pour vos conseils pour la poursuite de ceux-ci.

Je tiens également à remercier la **Dr. Chantal Thibert** pour sa participation à mon dernier CSI et ses conseils concernant les mesures enzymatiques de mes dernières expériences.

Je tiens ensuite à remercier les équipes « Physiopathologie de la motivation » et « Neuroimagerie fonctionnelle et perfusion cérébrale » pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et pour ce que vous m'avez apporté durant ces 6 dernières années d'un point de vue scientifique et personnel.

Je souhaiterais remercier mes deux encadrantes de thèse **Sabrina Boulet** et **Florence Fauvelle** pour leur soutien et leur patience au cours de mes stages et de cette thèse notamment durant les périodes de rédaction.

Sabrina, même si je n'étais pas ton candidat favori le jour de l'entretien j'espère que ces années auront permis de te faire changer d'avis. Merci pour ton implication, tes conseils et ton soutien durant toutes ces années autant sur le plan scientifique que personnel. Malgré ton emploi du temps chargé en tant que maître de conférence tu as toujours su répondre présente, de la chirurgie d'une centaine de petits Norbert en une semaine jusqu'à pas d'heure en M2 à la relecture de ce manuscrit.

Tu m'auras permis de rebondir dans les moments difficiles et malgré un parcours semé d'embûches tu auras su m'accompagner, m'aider ou simplement me rassurer quand j'en avais

besoin. Depuis l'oral de master 1 où mes 100 pas ont fini par user ta patience, jusqu'à une répétition pour préparer l'entretien du postdoc, en visio à une heure peu conventionnelle. Même s'il reste pas mal de boulot tu m'as permis d'adopter une partie des codes de ce milieu et de rentrer, dans le moule d'un chercheur. Ton expérience, associée à ton franc parlé, m'aurons également permis d'ouvrir les yeux sur ce qu'est le monde de la recherche. Merci pour ton accompagnement et ton soutien durant ces dernières années qui ont façonné la personne que je suis devenu.

Florence, un grand merci pour la patience dont tu as fait preuve pour m'initier au monde de la RMN et de la métabolomique. Bien que je n'aie pas réussi à dépasser le stade d'utilisateur de la métabolomique, tes conseils et ton implication m'ont permis d'avoir la chance de manipuler sur l'un des plus hauts champs d'Europe et amener ce projet de thèse bien plus loin qu'escompter. Au-delà de ces aspects techniques, et même s'il reste du chemin à parcourir, tu m'auras conduit à toujours prendre du recul sur mes travaux et sur la science en générale. Tu as également toujours su m'accompagner et te rendre disponible pour la préparation d'oraux, la correction des manuscrits, discuter sciences ou simplement répondre à mes questions de néophyte. Même si la forme a été parfois décousue tu es constamment à la recherche de nouvelles idées et tu m'as ainsi montré que la recherche ne s'arrête jamais. Enfin, à travers nos différentes manipulations au CEA ou à l'IBS, les congrès du RFMF ou encore les fameuses retraites de l'équipe 5 (où je suis d'ailleurs toujours vaincu au time's up !) tu m'as également permis de grandement développer mon réseau professionnel et m'ouvrir à la grande famille de la métabolomique.

Même s'il a été parfois difficile de jouer le rôle de tampon au centre de vos visions croisées des choses, je pense que je ressors grandis de cette expérience de co-encadrement et je vous remercie encore une fois pour votre soutien durant toutes ces années.

Je voudrais ensuite remercier les chefs d'équipe **Sebastien Carnicella** et **Emmanuel Barbier** d'avoir cru en moi et de m'avoir donné les moyens de réaliser cette thèse.

Sebastien, merci pour la disponibilité dont tu as fait preuve à mon égard, que ce soit pour la relecture des manuscrits d'articles, me transmettre ta passion pour les statistiques ou juste parler sciences et ainsi me permettre de voir mes résultats sous un autre angle. Pour autant, je me souviendrais aussi des « à cotés » peu scientifiques même en plein congrès, entre raclée au baby-foot, footing forcé (même si avec la vue ce n'était finalement pas si mal)

et virée nocturne la veille de présentation de poster. Félicitations pour les financements récemment obtenus et bon courage pour la suite (surtout avec autant de filles...).

Emmanuel, merci à toi qui as toujours été présent pour répondre à mes sollicitations notamment pour la relecture des manuscrits malgré ton emploi du temps déjà bien rempli. A travers les présentations à l'équipe, ta vision extérieure a permis d'amener de nouvelles réflexions concernant le projet. Bien que l'on ait finalement peu échangé dans la vie de tous les jours tu as toujours été bienveillant sur l'avancée du projet et je me souviendrais de discussions lors des retraites de l'équipe, où tu me partageais ton expérience et ta vision des choses sur la recherche actuelle.

Un grand merci également à **Carole** pour tout ce que tu as pu m'apporter durant ces dernières années. D'abord d'un point de vue technique et scientifique pour former le petit étudiant de M1 qui pensait qu'au talent ça irait. Puis humainement pour adopter les codes de la recherche et freiner un peu mon manque d'inhibition. Mais surtout sur le plan personnel où tu auras grandement contribué à ma façon de voir et d'entreprendre les choses notamment vis-à-vis de la recherche mais pas que... Je me souviendrais toujours du regard noir que j'ai reçu en comparant tes cours à la salle à une « choré de danse » et surtout des rires devant le fait accompli de mon manque de coordination motrice (un jour je réussirai les kicks !). Tu m'as inculqué ce dépassement de soi et le fait de sortir de sa zone de confort à la salle mais aussi au labo et finalement dans la vie de tous les jours. Pendant mon M1, en parlant de la suite, tu m'as dit que tu t'étais fait ton avis sur moi, 6 ans plus tard je ne sais si ce que tu avais imaginé mais en tout cas un grand merci de m'avoir accompagné tout au long de cette aventure et pour tous nos moments partagés.

Merci à **Thibault**, dit « le bon », mon formateur des premières heures. Dès mon arrivée au laboratoire j'ai eu la chance de former un duo avec toi et le lancement de notre « manip 110 ». A tes cotés au-delà de tes goûts musicaux « atypiques » j'aurais surtout appris comment travailler avec rigueur sans pour autant devenir parano (ou presque). Malgré le fait que cette manip nous ai fait prendre des chemins différents on a toujours su s'entraider, que ce soit pour masser des queues ou pipeter de l'eau et ce peu importe le jour ou l'heure (« à 18h30 max c'est fini »).

Bien que tu aies rendu la vie de tous les jours plus facile au labo, je crois que notre amitié c'est réellement construite au-delà de ces murs et ce malgré les humiliations subies à la course à pied ou à la self (« on recommence, on recommence ! »). Je garderais bien évidemment en tête les moments partagés lors des congrès, des apéros (« aller prend le dernier »), à tes talents tchatteur de danseur, en passant pour ta passion naissante pour le triton ou encore ta capacité à présenter tes datas en toutes conditions.

Même si la page GIN se referme pour moi aussi, il ne fait nul doute que nous avons encore de bons moments à partager !

Merci à **Raphaël**, dit « le truand » ou le distributeur de sourire. Merci pour ta bonne humeur au quotidien à l'exception des périodes de stress comme lors du dernier mois ou à quelques minutes de ta rencontre avec Cricri. Le moins que l'on puisse dire c'est que cette aventure n'aurait pas été la même sans ton arrivée au labo ! Alors oui peut être que mes dimanches soir auraient été différents que de faire des prises de sang ou de peser des bouteilles pourtant j'y retournerais sans hésiter !

Scientifiquement, on a toujours su s'entraider, se soutenir que ce soit au labo, ou durant la raclette la plus angoissante de notre vie. En delà de la science, malgré le nombre de raclées incalculable que j'ai pu te mettre au soccer, à clash, au badminton ou à la piscine, tous nos moments partagés lors de soirées, week-ends et gueuleton bien arrosés auront sans aucun doute forgé une belle amitié. Je tiens tout de même à ajouter que même si tu es désormais docteur ça ne t'empêchera pas de me faire le café la prochaine fois ! Encore merci pour tout ce que tu as pu m'apporter et ton soutien durant cette thèse et je te dis à bientôt en terre helvète pour la suite de nos aventures.

Merci également aux autres doctorants ou étudiants que j'aurais croisé durant mon parcours. Notamment mes deux comparses rencontrés en master **Aurélie** et **Sydney**, aujourd'hui docteurs, avec qui j'ai dû batailler pour que vous n'arrêtiez pas après le M1. Bravo à toutes les deux, et merci pour votre soutien tout au long de cette aventure.

Sydney même si on c'est un peu perdu de vue depuis quelque temps bon courage pour ta reconversion et pour la suite.

Aurélie, merci pour tous ces moments de rires que l'on a partagé au bureau, au bar, ou encore en congrès malgré le mal de crane. Un grand merci pour ton soutien et ton aide

notamment au cours des derniers mois. Qui aurait pu penser qu'une mindmap sur le moustique Zika nous emmènerait jusqu'à un duo qui peut se comprendre en un clin d'œil ?!

**Magali**, même si mes oreilles ont souffert, les repas du midi ont souvent été un bon moment de la journée grâce à tes potins et tes histoires bien à toi qui n'arrivent d'ailleurs qu'à toi... Malgré ce pète au casque qui te caractérise tu nous auras bien fait rigoler pendant toute cette aventure. Bon courage pour la suite aussi bien au labo qu'avec Steph (sans oublier Eddy la barrique) pour toutes les belles choses qui vous attendent.

Je remercie également le reste des équipes 5 et 18 avec qui j'ai interagi durant ma thèse. Tout d'abord, **Fiona**, merci pour tes nombreuses corrections en anglais que ce soit pour la préparation d'un oral ou encore très récemment pour la relecture de manuscrits. **Colin**, merci pour tes suggestions et ton aide au moment de planifier les manip, ton arrivée dans l'équipe a permis d'avoir une nouvelle vision lors des réunions d'équipe. **Marga, Nathalie, Marie-Claude, Marie-Christine**, merci pour votre support administratif et votre aide immédiate lorsque j'avais besoin de vous. Enfin, une pensée pour **Yvan**, désormais ex-ancien membre de l'équipe, merci pour ton aide dans la relecture de mon premier papier et bon courage pour ton retour (ps : vamos Rafa !).

Je tiens aussi à remercier les membres de l'institut des Neurosciences de Grenoble avec qui j'ai collaboré durant ma thèse, joué au soccer ou juste partagé un moment. Une attention particulière pour **Toff** et **Charlotte** qui m'ont formé aux western-blot et ont grandement contribué à mon second manuscrit. Merci également à **Jacques Brocard** pour son aide pour le développement de macro et l'utilisation des outils statistiques. Je remercie également **Véronique Sgambato, Pierre-olivier Fernagut, Paola Bosù** pour notre collaboration fructueuse permettant d'aboutir à mon premier papier.

Je souhaiterais également adresser des remerciements particuliers aux personnes qui m'ont supporté durant toute cette thèse et permis aussi parfois de prendre du recul. **Kevin** et **Jordan** merci pour votre soutien infailible durant toutes ces années malgré les moments difficiles vous avez toujours été là.

Keke je ne compte plus le nombre de pays que j'ai eu la chance de découvrir à tes côtés, à dormir dans des dortoirs de 50 ou encore faire des kilomètres dans des « taxi » très rustiques. Et même si les conditions n'étaient pas favorables les mois passés j'ai hâte de reprendre ces découvertes ! Et également de reformer ce trio avec Jojo à l'abordage de toutes les mainstage qui nous attendent, pouvoir s'envoler comme il se doit.

Merci également à **Tavel**, pour ta façon si particulière de voir la vie mais qui fait du bien parfois ! Toujours disponible pour partager quelques bons plans, les moments entre Lyon ou Biarritz m'auront permis de déconnecter quelque temps lorsque j'en avais besoin. Maintenant cap sur les vagues des Canaries !

Merci également à **Remy** pour ton soutien, toujours bienveillant à mon égard. J'espère pouvoir revenir rapidement voir tes progrès sur le terrain et sur l'échelle de Westbrook !

Enfin, même si cette thèse m'aura éloigné de plusieurs d'entre vous, un merci à la **bande du Fontanil**, je n'oublie pas ce que l'on a pu vivre ou partager durant ces dernières années.

Enfin je souhaiterais remercier ma famille pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix et supporté mon humeur des mauvais jours (ou semaines...).

Un merci particulier à **Jérôme** et plus généralement à **La Petite Toscane**, qui m'a permis de sortir de mon quotidien depuis maintenant presque 10 ans. Même si je vais bientôt quitter l'aventure et que les records ne seront donc plus envisageables, nul doute que vous formez un bon duo avec Nico et que ça va continuer !

**Papa, maman**, même si ce monde vous paraît parfois si étrange, vous avez toujours été là pour m'aider, me conseiller et me soutenir. Et même si je parle peu, et que je ne vous montre pas assez mon amour, je n'en pense pas moins et je tenais à vous remercier encore et encore pour tout ce que vous avez fait pour moi.



“Once you know what failure feels like,  
determination chases success.”

Kobe Bryant





# Table des matières

<b>Abréviations principales.....</b>	<b>3</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>5</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>8</b>
<b>Rappels bibliographiques.....</b>	<b>14</b>
<b>Chapitre 1 : La maladie de Parkinson.....</b>	<b>15</b>
A. Évolution des atteintes neuronales et symptomatologiques de la MP.....	17
1. La phase Préclinique (Stade 1 et 2) .....	19
2. Phase précoce (Stade 3) .....	21
3. Phase avancée (Stade 4).....	23
4. Phase tardive (Stade 5 et 6).....	25
B. Approches thérapeutiques de la MP.....	27
1. Thérapies à visée symptomatique.....	27
a. Stratégies pharmacologiques .....	27
i. La L-DOPA.....	27
ii. Les agonistes dopaminergiques.....	28
iii. Agents non dopaminergiques .....	29
b. Stratégie chirurgicale.....	29
2. Thérapies à visées préventive ou curative .....	31
a. Thérapie cellulaire dans la MP.....	31
b. Thérapie génique dans la MP .....	32
c. Approches pharmacologiques .....	35
C. Le diagnostic de la MP.....	36
1. Échelles diagnostiques.....	36
2. Méthodes d'imageries.....	39
<b>Chapitre 2 : Les modèles animaux de la maladie de Parkinson.....</b>	<b>42</b>
A. Modèles neurotoxiques .....	42
1. La 6-OHDA .....	42
2. Le MPTP.....	44
B. Modèles génétiques.....	47
1. Animaux transgéniques inspirés de forme monogénique.....	47
2. Animaux transgénique basés sur la surexpression d'alpha-synucléine.....	47
<b>Chapitre 3 : La métabolomique par RMN comme outil d'analyse du métabolisme, et de recherche de biomarqueurs pour la maladie de Parkinson .....</b>	<b>50</b>
A. La métabolomique .....	50
1. Définition .....	50
2. Méthodes d'analyses.....	51
a. La spectrométrie de masse.....	51
b. La résonance magnétique nucléaire .....	52
c. Utilisation combinée : SM et RMN.....	53
3. Analyse métabolomique par RMN .....	54
a. Le flux analytique.....	55
i. Phase pré-analytique : préparation des échantillons .....	55
ii. Phase analytique.....	57
b. Le flux de traitement des données RMN .....	58
i. Pré-traitement des spectres RMN .....	58
ii. Traitement des données : Statistiques multivariées.....	60
C. Études métabolomiques dans la maladie de Parkinson.....	64
1. Perturbations métaboliques et physiopathologie de la MP.....	64

a.	Métabolisme énergétique .....	65
i.	Métabolisme énergétique en condition physiologique .....	65
ii.	Dérégulation du métabolisme énergétique dans la MP .....	67
b.	La mitochondrie entre métabolisme énergétique et mort cellulaire .....	70
2.	Recherche de biomarqueurs : amélioration du diagnostic et de la prise en charge de la MP .....	72
	<b><i>Problématique et objectifs de travail .....</i></b>	<b>75</b>
	<b><i>Approches expérimentales principales .....</i></b>	<b>78</b>
	<b><i>Résultats.....</i></b>	<b>83</b>
A.	Article I - A metabolic biomarker for early stage of Parkinson’s disease in patients and animal models .....	85
B.	Article II - Re-routing metabolism by the mitochondrial pyruvate carrier inhibitor MSDC- 0160 attenuates neurodegeneration in a rat model of Parkinson’s disease .....	117
	<b><i>Discussion .....</i></b>	<b>183</b>
A.	Biomarqueur diagnostic de la MP : Défis actuels et perspectives futures .....	152
1.	Biomarqueur de la phase prodromale.....	153
2.	Défis méthodologiques pour faciliter l’accès à des biomarqueurs sensibles en clinique.....	155
a.	Choix de l’échantillon .....	155
b.	La métabolomique par RMN.....	157
3.	Biomarqueur sanguin et diagnostic différentiel de la MP .....	158
B.	Modification du métabolisme énergétique associé à MP .....	159
1.	Hypothèse de dérégulation métabolique : Découplage de la glycolyse et du cycle TCA .....	160
2.	Implication du MPC dans la MP : Effet neuroprotecteur de son blocage.....	161
3.	Implication de la PDH dans la physiopathologie de la MP .....	164
4.	La mitochondrie organite central dans l’approche thérapeutique de la MP ?.....	166
C.	Perspectives .....	167
1.	Diagnostic : Amélioration du biomarqueur .....	167
2.	Vers une thérapie curative de la MP ? .....	168
a.	MPC.....	168
b.	PDH .....	169
c.	Détermination d’autres cibles .....	170
	<b><i>Conclusion .....</i></b>	<b>172</b>
	<b><i>Annexes.....</i></b>	<b>174</b>
	<b><i>Références bibliographiques .....</i></b>	<b>223</b>

# Abréviations principales

6-OHDA : 6-hydroxydopamine  
AAV : Virus adéno-associé  
ACP : Analyse en composantes principales  
AMS : Atrophie multi-systématisée  
ATP : Adénosine triphosphate  
CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill  
GPe : Globus pallidus externe  
GPi : Globus pallidus interne  
IRM : Imagerie par résonance magnétique  
LCR : Liquide céphalo-rachidien  
L-DOPA : Levodopa  
MAO-B : Monoamines oxydases  
MP : Maladie de Parkinson  
MPC : Transporteur mitochondrial du pyruvate  
MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine  
NST : Noyau subthalamique  
OPLS : Régression des moindres carrés partiels orthogonale  
PDH : Pyruvate déshydrogénase  
PFF : Fibrilles préformées  
PLS : Régression des moindres carrés partiels  
PSP : Paralyse supranucléaire progressive  
ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
RMN : Résonance magnétique nucléaire  
SHF : Stimulation haute fréquence  
SM : Spectrométrie de masse  
SNc : Substance noire compacte  
TEP : Tomographie par émission de positons  
TCA : Cycle de l'acide citrique  
TH : Tyrosine hydroxylase  
TZD : Thiazolidinédiones

# Avant-propos

Cette thèse a été financée par l'ANR DOPALCOMP (ANR-16-CE16-0002), la dotation INSERM et l'association France Parkinson

Les résultats obtenus et la synthèse de la littérature réalisée au cours de ma thèse ont fait l'objet d'une publication scientifique en cours de parution, d'une publication à venir et au dépôt d'une demande de brevet (BNT230419FR00).

- **A metabolic biomarker for early stage of Parkinson's disease in patients and animal models**

**Mallet David**, Thibault Dufourd, Mélina Decourt, Carole Carcenac, Paola Bossù, Laure Verlin, Pierre-Olivier Fernagut, Marianne Benoit-Marand, Gianfranco Spalletta, Emmanuel L. Barbier, Sebastien Carnicella, Véronique Sgambato, Florence Fauvelle\*, Sabrina Boulet\* (Journal of clinical investigations, 2022). \*co-senior authors

- **Re-routing metabolism by the mitochondrial pyruvate carrier inhibitor MSDC- 0160 attenuates neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease**

**Mallet David**, Goutaudier Raphaël, Barbier Emmanuel, Carnicella Sébastien, Colca Jerry, Fauvelle Florence\*, Boulet Sabrina\* (Molecular neurobiology, under revision). \*co-senior authors

Autres articles auxquels j'ai participé :

- **Plasma or serum? A qualitative study on rodents and humans using high-throughput microRNA sequencing for circulating biomarkers**

Thibault Dufourd, Noémie Robil, **David Mallet**, Carole Carcenac, Sabrina Boulet, Sonia Brishoual, Emilie Rabois, Jean-Luc Houeto, Pierre de la Grange, Sebastien Carnicella (Biology Methods and Protocols, 2019)

- **Hypodopaminergic state of the nigrostriatal pathway induces compulsive and withdrawal alcohol-related behaviors.**

Raphaël Goutaudier, **David Mallet**, Magali Bartolomucci, Denis Guicherd, Carole Carcenac, Frédérique Vossier, Thibault Dufourd, Sabrina Boulet, Colin Deransart, Benoit Chevolon, Sébastien Carnicella (Molecular psychiatry, submitted).

- **Metabolic dysregulation in serum predicts compulsive alcohol use: a preclinical study.**

Raphaël Goutaudier\*, **David Mallet\***, Magali Bartolomucci, Florence Fauvelle, Sabrina Boulet, Sébastien Carnicella (in preparation – Annexe 3). \*co-first authors





# Introduction

« C'était donc ça, ce léger - si léger ! - tremblement de la main ? Cette écriture qui, du jour au lendemain, s'est mise à foutre le camp dans toutes les directions ? Cette irréaliste sensation de flou dans la démarche, de ralenti dans les gestes ? »

J'ai demandé au neurologue :

*« C'est certain ? Je veux dire : absolument ? »*

*- Oh, pour ça, absolument. Vous ne présentez pas tous les symptômes, mais ceux que vous avez sont concluants. »*

Très content de lui. Brave homme, au fond, il minimisa :

*« Vous avez de la chance. »*

*- Ah, ouais ?*

*- Vous auriez pu, du premier coup, présenter des symptômes très marqués. Vous ne vous en tirez pas trop mal, surtout étant donné votre âge.*

*- Qu'est-ce qu'il a, mon âge ?*

*- Eh bien, généralement, les symptômes apparaissent plus tôt. Si bien que, parvenus à votre âge, les patients sont beaucoup plus, si j'ose dire, «avancés» que vous.*

*- Vous voulez dire que ça va s'aggraver ?» [...]*

Il s'excusa au nom de la science :

*« On y travaille activement. Mais, jusqu'ici, on n'a trouvé que des palliatifs. »*

*- C'est-à-dire ?*

*- On agit sur les symptômes. On a pu synthétiser la molécule qui fait défaut et on la fournit à l'organisme.*

*- Mais c'est merveilleux ! Et ça fonctionne ?»*

Le docteur hésita, me jaugea, décida d'être franc :

*« Un certain temps. Ensuite, il faut augmenter les doses. »*

*- Indéfiniment ? Jusqu'où ?*

*- Je serai là. Je ne vous abandonnerai pas. Et puis, la science progresse, vous savez. »*

Extrait de « Lune de miel » de François Cavanna

Malgré sa découverte il y a plus de 200 ans, et bien qu'elle représente la seconde affection neurodégénérative dans le monde, la maladie de Parkinson (MP) décrite comme « salope infâme » par F. Cavana, reste mal diagnostiquée et sa prise en charge limitée.

La MP affecte aujourd'hui plus de 6 millions de personnes dans le monde, contre 2,5 millions en 1990 (Ray Dorsey et al., 2018). En une génération, son incidence a donc plus que doublé, en raison, entre autres, du nombre croissant de personnes âgées, de l'allongement de la durée de vie, et de différents facteurs environnementaux. Ainsi, l'impact social et économique de la MP va continuer de croître de manière importante dans les prochaines années (Kalia, L. V., and Lang, 2015).

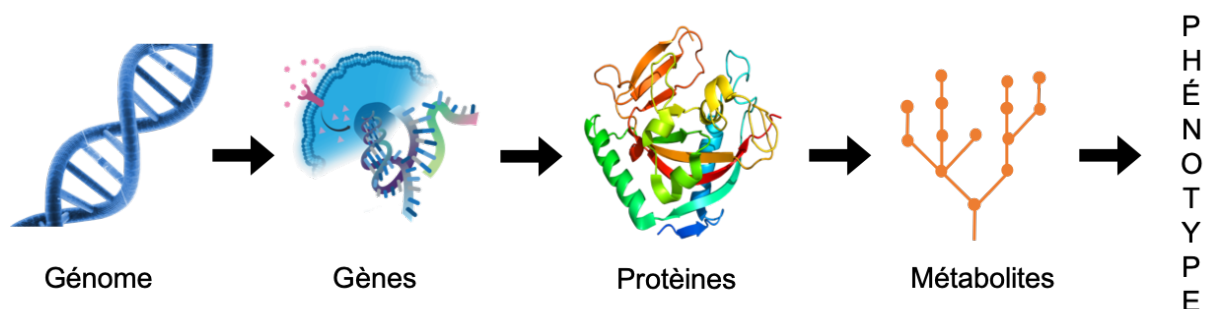
La MP se caractérise notamment par la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques au sein de la substance noire compacte (SNc) qui engendre l'apparition de symptômes caractéristiques que sont la rigidité, l'akinésie (difficulté à initier un mouvement), la bradykinésie (mouvements anormalement lents) et le tremblement de repos. C'est suite à l'apparition de ces troubles moteurs que le diagnostic peut être établi, bien qu'il n'existe aucune certitude avant la confirmation histologique post mortem. De plus, ces troubles ne se manifestent que tardivement, lorsque la perte neuronale, déjà très avancée, n'est plus masquée par des phénomènes compensatoires permettant de limiter initialement son impact. La découverte de la pathologie à des stades avancés conduit à une prise en charge tardive des patients, limitant son efficacité. Ainsi, à ce jour, il n'existe aucune stratégie thérapeutique permettant de prévenir, ralentir ou stopper la MP et les traitements restent uniquement symptomatiques. Parmi eux, la dopathérapie est le traitement pharmacologique le plus utilisé car le plus efficace. En effet, ce traitement consiste à la prise quotidienne de Levodopa (L-DOPA), le précurseur métabolique de la dopamine, qui permet de restaurer la concentration en dopamine et ainsi considérablement améliorer les symptômes moteurs. Cependant, après 5 à 10 années d'efficacité, associée à l'augmentation des doses pour pallier à la progression continue de la maladie, des effets secondaires apparaissent.

Par ailleurs, bien que de multiples tentatives de neuroprotection se soient révélées prometteuses sur un plan préclinique, elles ont échoué chez le patient car appliquées trop tardivement. Aujourd'hui, ce diagnostic tardif représente donc une étape limitante pour le développement d'un traitement curatif et pour la prise en charge correcte des patients. Pourtant, les phases qui précèdent l'apparition des symptômes moteurs de la maladie ne sont pas totalement muettes d'un point de vue symptomatologique, et les patients peuvent

présenter une pléiade de symptômes de type non moteurs, et notamment des symptômes d'ordre neuropsychiatrique qui peuvent s'exprimer très précocement (Schapira et al., 2017). Néanmoins, à eux seuls, ces symptômes, qui sont également communs à d'autres pathologies, ne permettent pas d'établir un diagnostic précoce de la MP.

C'est pourquoi de nouvelles approches se développent, dans le but de permettre un diagnostic à la fois plus précoce et plus spécifique de la MP. Parmi celles-ci, la recherche de biomarqueurs connaît un réel essor. Les biomarqueurs ont pour but d'apporter une valeur ajoutée par rapport aux outils actuellement utilisés (par exemple permettre un diagnostic plus précoce), de permettre une meilleure prise en charge du patient (pronostic, réponse au traitement...), d'être mesurables facilement et de manière reproductible (dosage sanguin, urinaire...). Ainsi, l'exaltation autour de la recherche de biomarqueurs a notamment conduit au développement de nouvelles disciplines telles que les sciences « omics ». En effet, là où précédemment la recherche se concentrait à vérifier des hypothèses, le vivant peut désormais être appréhendé dans sa totalité et sans a priori via l'utilisation des sciences « omics » qui permettent d'obtenir de grandes quantités d'informations biologiques associées à des pathologies.

En s'appuyant sur des technologies de pointe, les sciences « omics » permettent d'étudier tous les types de phénotypes, résultant de l'intégration simultanée de signaux intrinsèques et extrinsèques, provenant à la fois du génome et de l'environnement, comme c'est le cas pour la MP (Figure 1).



**Figure 1 : Représentation schématique des strates étudiées par les sciences « omics »**

Les signaux intrinsèques sont le résultat d'étapes successives de régulation et d'utilisation de l'information contenue dans les gènes. À la base de tout, se trouve l'ADN génomique, présent dans toutes les cellules vivantes, où toutes les informations nécessaires

à la vie sont codées et stockées. Selon les conditions dans lesquelles la cellule se trouve, une partie de cette information est traitée et transcrite, puis traduite en ARN messager puis en protéines. Certaines de ces protéines ont un rôle d'enzyme et agissent comme catalyseurs des réactions chimiques constituant le métabolisme et conditionnent ainsi les phénotypes. Les sciences « omics » se proposent donc d'observer l'ensemble des réactions et modifications d'un système biologique dans chacune de ces différentes strates.

Plus particulièrement, c'est le métabolome (la couche sous-jacente du génome, du transcriptome et du protéome) qui reflète toutes les informations exprimées et modulées par toutes les autres couches « omics » (Nicholson et al., 1999). En effet, alors que les gènes et les protéines sont soumis à des régulations épigénétiques ou post-traductionnelles, les métabolites sont les signatures directes du métabolisme et intègrent ainsi l'ensemble des influences internes et externes pouvant modifier le phénotype. Par ailleurs, le métabolisme étant un processus dynamique, il est également modulable, et peut, dans certains cas, compenser l'effet d'une mutation, la rendant silencieuse d'un point de vue phénotypique. Dans ce cas, les mutants sont phénotypiquement similaires aux non mutants, mais la manière d'exprimer leur phénotype (réactions métaboliques) est différente, et les concentrations des différents métabolites dans la cellule aussi. Ainsi, observer un organisme sous l'angle métabolique permet d'intégrer l'ensemble des variabilités génétiques et environnementales, ainsi que tous les niveaux de régulation génomique (Wishart, 2016, 2019).

C'est pourquoi le métabolome est le lien le plus proche du phénotype et représente donc le candidat idéal dans le développement de biomarqueurs, d'autant plus que la métabolomique (étude du métabolome) est applicable sur un ensemble d'échantillons facilement accessibles en clinique tel que le sang (A. Zhang et al., 2015). De plus, elle permet de suivre l'évolution d'un phénotype suite à différents traitements ou thérapies, ouvrant les possibilités d'une médecine personnalisable pour chaque patient (Everett, 2015; Wishart, 2016).

Enfin, la métabolomique peut également être utilisée à des fins de compréhension des mécanismes physiopathologiques caractéristiques des pathologies, mettant en lumière des dérégulations spécifiques de certaines voies ou réactions du métabolisme (Wishart, 2019).

Dans ce contexte, ma thèse, dans son ensemble, a visé à étudier les variations métaboliques liées à la MP, notamment durant la phase précoce, via l'approche

métabolomique. Plus précisément, les objectifs étaient d'une part d'établir un biomarqueur spécifique de la MP afin d'améliorer son diagnostic et de le rendre plus précoce, et d'autre part, de déterminer les voies métaboliques impactées dans la MP pour proposer d'éventuelles cibles thérapeutiques.

# Rappels bibliographiques



## Chapitre 1 : La maladie de Parkinson

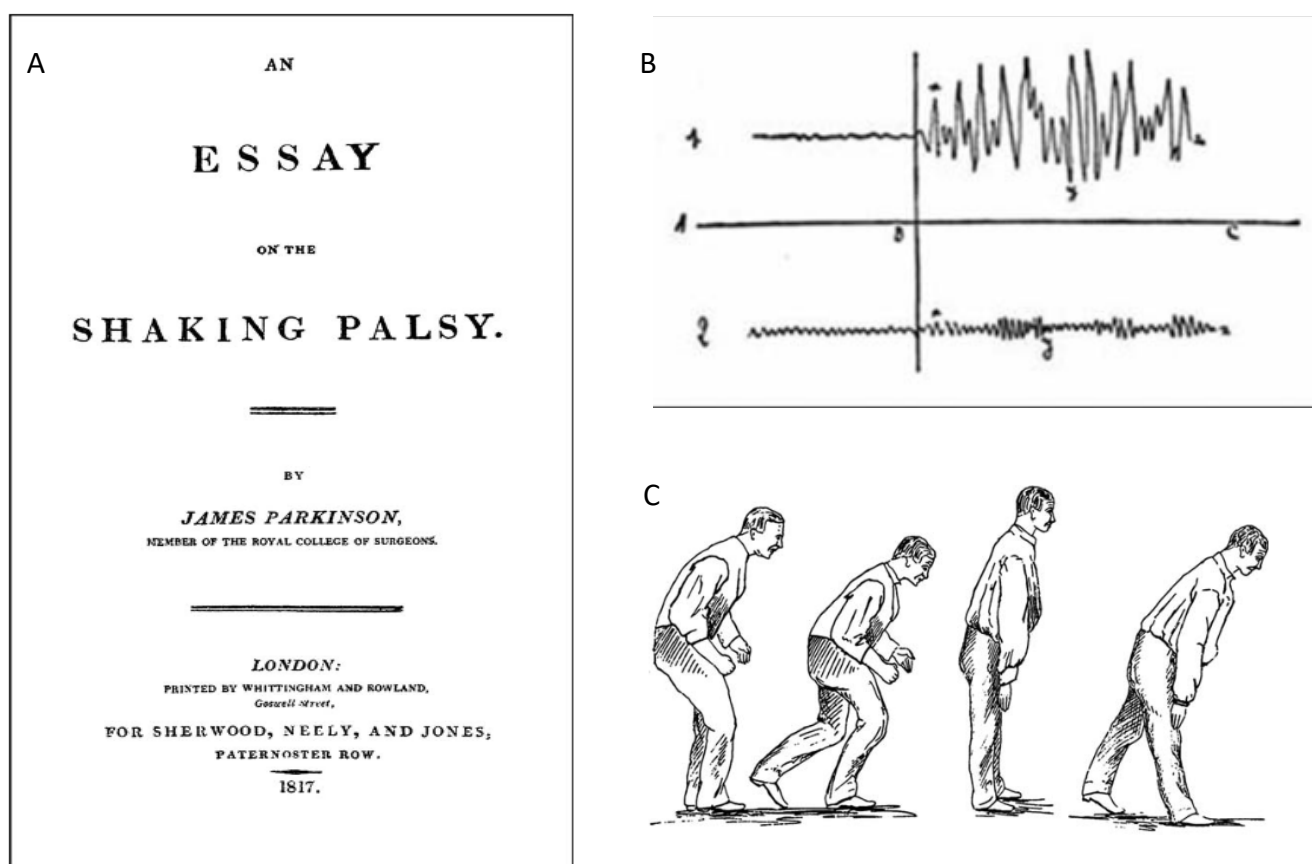
La maladie de Parkinson (MP) et ses manifestations ont été décrites pour la première fois de façon détaillée en 1817 dans l'essai clinique « paralysie agitante » de James Parkinson (*An essay of shaking palsy*, Figure 2A). Dans ce traité, basé sur six cas, il décrit chez ses patients des mouvements tremblants involontaires accompagnés d'une puissance musculaire réduite. Il relève également une propension à plier le tronc en avant et à passer d'un pas de marche à un rythme de course. Bien que l'essai de J. Parkinson soit maintenant reconnu comme le véritable travail fondateur permettant de décrire la maladie, cette publication n'a guère retenu l'attention lors de sa sortie. En effet, ce n'est que soixante ans plus tard, que Jean Martin Charcot, un neurologue français, approfondit la symptomatologie spécifique de la pathologie (Figure 2B) en distinguant notamment différents types de MP (Figure 2C), et reconnaît l'importance des travaux de J. Parkinson, nommant ainsi cette affection : « Maladie de Parkinson » (Walusinski, 2018). En effet, les premières observations de J. Parkinson décrivaient uniquement l'aspect moteur de la pathologie, précisant même que les sens et l'intellect n'étaient pas affectés. La première description de troubles non moteurs, et notamment des troubles d'ordre cognitif, n'a vu le jour qu'en 1882, suite aux travaux de Benjamin Ball qui reporta le cas d'un patient ayant développé des hallucinations et deux autres cas ayant développé de l'irritabilité et de la dépression. Ces observations ont par la suite été confortées par celles d'Huggard décrivant des patients parkinsoniens présentant des manies récurrentes, ou encore celles d'Atkins rapportant des hallucinations (Goetz, 2011).

Aujourd'hui, la MP est le trouble neurodégénératif le plus répandu après la maladie d'Alzheimer. Avec une prévalence de 2 à 3 % de la population de plus de 65 ans (Samii et al., 2004) et qui augmente de manière quasi-exponentielle avec l'âge, atteignant un pic après 80 ans (Pringsheim et al., 2014), elle affecte aujourd'hui près de 6 millions d'individus dans le monde. De plus, compte tenu du vieillissement de la population, dû à la hausse de l'espérance de vie, le nombre de personnes atteintes de la MP devrait augmenter de plus de 50 % d'ici 2030 (Kalia, L. V., and Lang, 2015).

Caractérisée par une triade de symptômes moteurs composée de bradykinésie, tremblements de repos, et rigidité, la MP se traduit également par d'autres symptômes et notamment des troubles neuropsychiatriques. Ces symptômes non moteurs peuvent

apparaître avant les symptômes moteurs, qui ne se manifestent qu'après 50-60 % de dénervation dopaminergique au sein de la SNc. Ce fractionnement dans l'apparition des symptômes reflète un processus neurodégénératif lent qui se manifeste dans l'évolution de la MP en différentes phases caractéristiques.

Dans ce chapitre, je détaillerai d'abord les atteintes neurologiques et les symptômes associés qui caractérisent les différentes phases de la MP. Je m'attarderai ensuite sur les différentes stratégies thérapeutiques existantes et celles envisagées afin de prendre en charge la MP. Enfin, je détaillerai le processus de diagnostic de la MP permettant la mise en place de ces stratégies.



**Figure 2 : La maladie de Parkinson.**

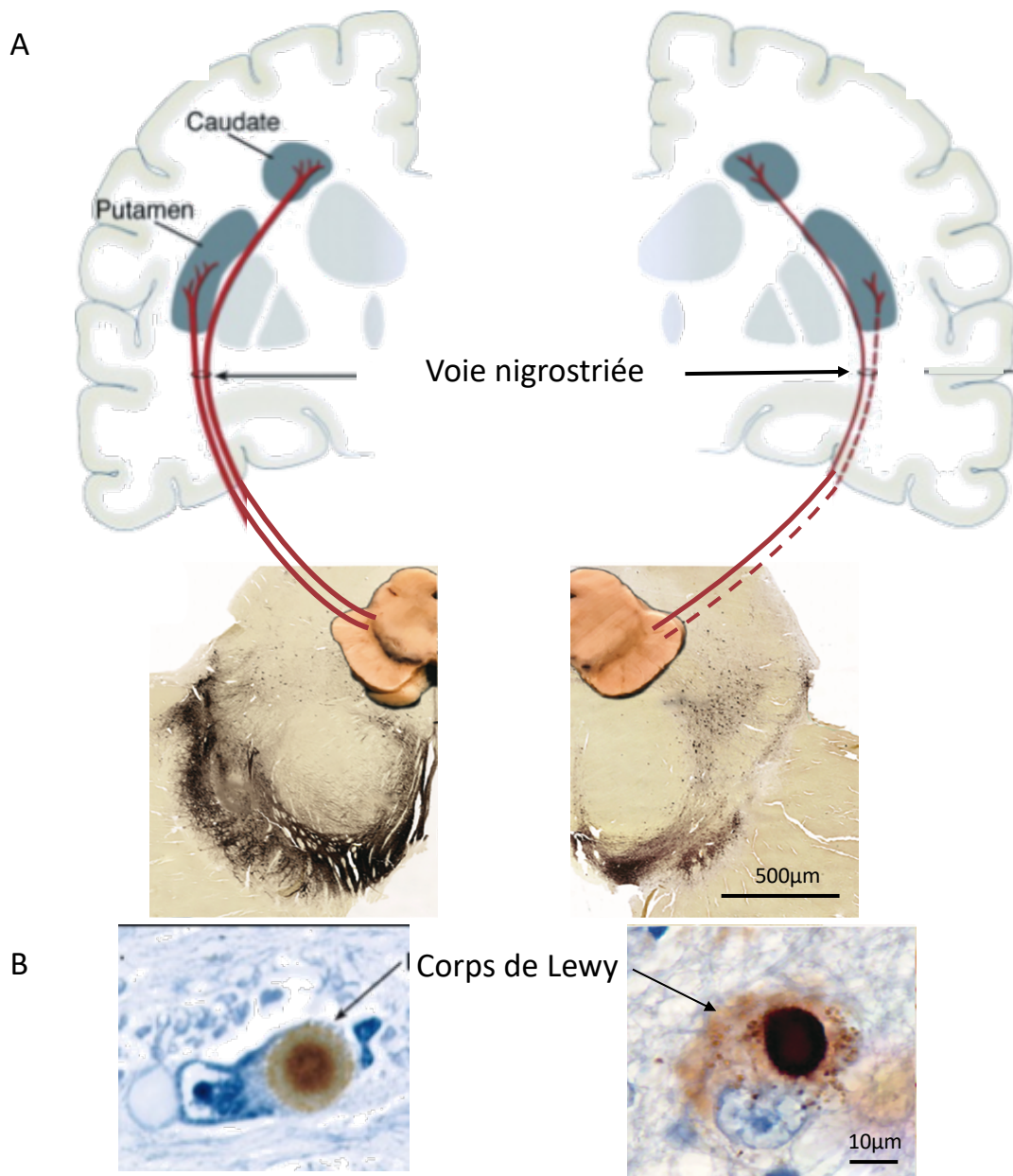
(A) Préface de l'essai « Shaking palsy » du Dr James Parkinson, premier document médical clair traitant de la maladie de Parkinson (1817). (B) « Courbes myographiques » publiées par Charcot en 1887. Le tracé supérieur représente un tremblement intentionnel dans la sclérose en plaques. Le segment A-B correspond au patient « au repos » et B-C indique des oscillations croissantes pendant le mouvement volontaire. Le tracé inférieur représente un tremblement parkinsonien, le segment A-B indiquant un tremblement au repos, qui persiste dans le segment B-C pendant le mouvement volontaire. (C) Dessin de Charcot illustrant une maladie de Parkinson « typique » montrant une posture fléchie (à gauche) et une variante

parkinsonienne incluant l'absence de tremblement et une posture étendue (à droite). (*Adapté de Goetz, 2011*)

## A. Évolution des atteintes neuronales et symptomatologiques de la MP

Même si la MP est majoritairement diagnostiquée chez les personnes âgées, comme dit précédemment, c'est un trouble neurodégénératif à progression lente qui commence plusieurs années avant que le diagnostic probable ne puisse être posé. De plus, la confirmation du diagnostic ne peut être effectuée que post mortem, et repose sur la présence de deux marqueurs : la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc (Figure 3A) et la présence d'inclusions intraneuronales d'agrégats d'alpha-synucléine (nommées corps de Lewy) dans différentes zones cérébrales (Figure 3B).

Ainsi, Braak et ses collaborateurs ont proposé une classification de l'évolution de la MP reposant sur l'extension rostrocaudale de l'apparition des corps de Lewy permettant de différencier différents stades de la pathologie, connue sous le nom de théorie de Braak (Braak et al., 2003). Cette classification, largement étayée par les observations histologiques, fait actuellement consensus. Elle permet de diviser la MP en 6 stades anatomo-pathologiques qui correspondent à 4 phases cliniques : la phase préclinique, la phase précoce, la phase avancée, et la phase tardive.



**Figure 3 : Représentation des altérations de la voie dopaminergique nigrostriée dans la maladie de Parkinson**

(A) Réduction marquée du pigment de neuromélanine dans la substantia nigra pars compacta (SNc) chez un patient atteint de la MP (à droite) par rapport à un individu normal (à gauche).  
 (B) Marquage immunohistochimique des corps de Lewy, dans un neurone dopaminergique de la SNc. L'alpha-synucléine se situe préférentiellement au centre (partie foncée) de ces inclusions. (Adapté de Poewe et al., 2017 ; Dauer & Przedborski et al., 2003)

## 1. La phase Préclinique (Stade 1 et 2)

Le début de la maladie ou stade 1, se caractérise par l'accumulation d'alpha-synucléine au niveau des neurones du bulbe olfactif et du noyau dorsal moteur des nerfs vague et glossopharyngien. En effet, selon Braak, en contact permanent avec l'extérieur, le système olfactif pourrait représenter, une porte d'entrée pour les facteurs environnementaux toxiques tels que les pesticides dont l'impact sur le développement de la MP est désormais admis (Hawkes et al., 2007).

Les nerfs vague et glossopharyngien sont des nerfs mixtes qui appartiennent au système nerveux végétatif et qui régulent de façon autonome le fonctionnement de la plupart de nos constantes vitales telles que la tension, le rythme cardiaque, la respiration et la déglutition. De plus, le nerf vague est également lié au système entérique et assure la quasi-totalité de l'innervation extrinsèque du tube digestif. Ainsi, des modèles précliniques de la MP chez la souris, utilisant une surexpression de l'alpha-synucléine au niveau cérébral, montrent une accumulation d'agrégats d'alpha-synucléine au niveau gastro-intestinal (Wang et al., 2012). De plus, il a été montré qu'une injection d'alpha-synucléine mal repliée au sein de l'intestin de souris conduit à une migration de la protéine jusqu'au cerveau et au développement des symptômes caractéristiques de la MP, corroborant ainsi l'hypothèse de Braak et collaborateurs qui proposent que la MP pourrait débiter de manière périphérique (S. Kim et al., 2019).

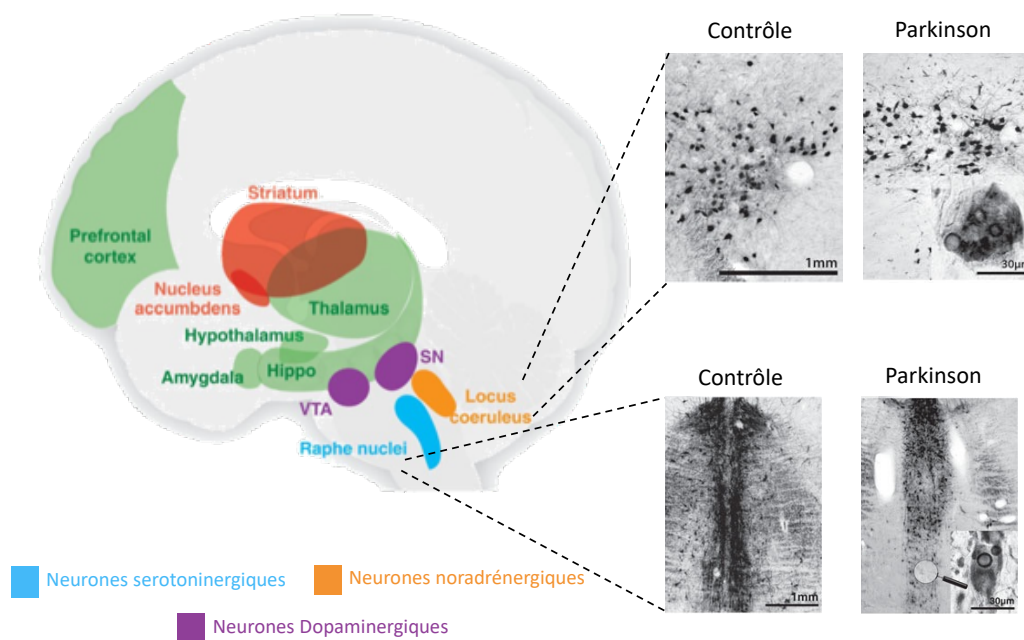
L'atteinte du bulbe olfactif conduit chez 70 à 90 % des patients parkinsoniens au développement d'une hyposmie très précoce (Herting et al., 2008). Par ailleurs, l'atteinte des nerfs mixtes peut entraîner plusieurs types de symptômes aspécifiques allant de la constipation, compte tenu du lien entre nerf vague et l'intestin, à l'hypotension, en passant par des problèmes de déglutition ou encore des troubles du rythme cardiaque (Dickson et al., 2009; Pfeiffer, 2011).

Le stade 2 de la phase préclinique se caractérise par la progression de l'accumulation des corps de Lewy aux structures inférieures du pont et l'affection plus importante du nerf vague. En effet, les parties inférieures du noyau pédonculopontin, du locus coeruleus et du noyau du raphé sont affectées, impactant ainsi respectivement les systèmes cholinergique, noradrénergique et sérotoninergique (Figure 4).

Des études histologiques réalisées chez des patients parkinsoniens ont même montré qu'avec des pertes neuronales pouvant atteindre jusqu'à 83 %, le locus coeruleus pouvait représenter la structure la plus impactée dans la MP (Zarow et al., 2003). L'atteinte du noyau pédonculo-pontin entraîne notamment des troubles du sommeil paradoxal ou sommeil REM (Rapid eye movement) (French & Muthusamy, 2018), qui, avec une prévalence allant jusqu'à 70 % des patients parkinsoniens, représentent l'un des symptômes avant-coureurs les plus prédictifs de la MP (Adler et al., 2011; J. Zhang et al., 2017). Ainsi, les cohortes de sujets présentant des troubles du comportement du sommeil paradoxal isolé (iRBD) représentent un intérêt majeur dans l'étude des phases précoces de la MP. De plus, l'atteinte des systèmes noradrénergique et sérotoninergique va se traduire par l'apparition de symptômes d'ordre neuropsychiatrique. Parmi eux, la dépression semble le plus répandu, avec une prévalence variant de 50 à 90 % des patients parkinsoniens selon les études considérées (Aarsland et al., 2012; Poewe & Seppi, 2001; Reijnders et al., 2008). Dans le cadre de la MP, la dépression se traduit par une tristesse de l'humeur, un pessimisme, une péjoration de l'avenir et peut s'accompagner d'anxiété. Cependant à l'inverse de la dépression classique, la culpabilité y est peu présente (K. R. Chaudhuri et al., 2006; Ehrt et al., 2006). Ainsi, elle a un impact majeur sur la capacité fonctionnelle et sur la qualité de vie des patients. Malgré cela, la dépression est souvent non prise en compte chez le patient parkinsonien et donc sous-traitée (K. R. Chaudhuri & Schapira, 2009; Leentjens, 2004). De plus, à un stade tardif, cette absence de prise en compte est encore exacerbée car le patient communique peu et/ou peut être atteint de troubles cognitifs.

Bien que l'anxiété puisse être considérée comme un des symptômes de la dépression parkinsonienne, elle peut aussi exister de manière indépendante (Menza et al., 1993; Thobois et al., 2010). Elle peut se manifester de différentes façons, allant des troubles anxieux généralisés à des formes d'attaques de panique ou encore des symptômes phobiques.

Tout comme la dépression, les troubles de l'anxiété semblent être sous-évalués et sous-traités chez les patients atteints de la MP, notamment en raison de l'imprécision du diagnostic et du chevauchement des symptômes avec les caractéristiques motrices et cognitives (Gallagher et al., 2014; Weisskopf et al., 2003). Elle est pourtant fréquemment présente chez les patients avec une prévalence d'environ 40 %, contre 5 à 15 % dans la population générale (Pontone et al., 2009, 2011).



**Figure 4 : Atteinte des systèmes dopaminergique, sérotoninergique et noradrénergique dans la MP. (Adapté de Halliday et al, 2013)**

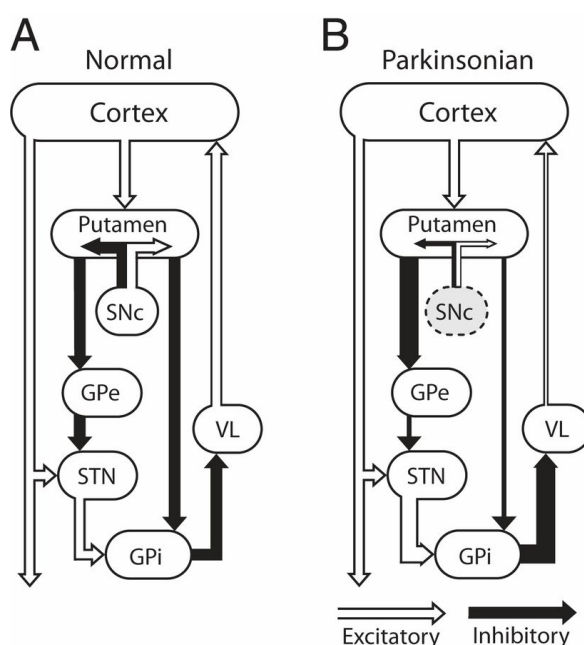
## 2. Phase précoce (Stade 3)

Le stade 3 se caractérise par une accumulation d'alpha-synucléine plus importante des noyaux précédemment cités, mais également par l'atteinte des noyaux gris non thalamiques tels que le noyau de Meynert et l'amygdale. Le noyau de Meynert représente l'innervation cholinergique majeure du cortex et de l'amygdale, et jouerait un rôle dans l'éveil cortical et les fonctions cognitives (D. J. Lee et al., 2020). Au sein du complexe amygdalien, les noyaux central et basolatéral sont les principaux noyaux impactés.

Enfin, c'est durant cette phase que les premières atteintes du système dopaminergique caractéristiques de la MP apparaissent, touchant d'abord les parties caudale et ventrolatérale de la SNc. Cette mort neuronale se traduit par un déséquilibre au sein des ganglions de la base (GB). Les GB sont un ensemble de structures sous-corticales composé de quatre noyaux principaux : le striatum (ou putamen), le pallidum subdivisé en segments interne (Gpi) et externe (Gpe) la SNc et le noyau subthalamique (NST). Le striatum est considéré comme la principale structure d'entrée du circuit puisqu'il reçoit une forte innervation dopaminergique provenant du mésencéphale, de nombreuses afférences glutamatergiques excitatrices provenant du cortex cérébral ainsi que du thalamus (BOLAM et al., 2000). La notion de voie

directe et indirecte repose sur la subdivision des neurones selon leurs projections et leurs signatures moléculaires ; la dopamine ayant une fonction opposée sur ces 2 voies (J. Park et al., 2020)(Figure 5).

La voie directe est formée des neurones qui projettent sur le GPi. L'activation des récepteur dopaminergique 1 (D1) par la dopamine va favoriser l'inhibition du GPi. L'inhibition tonique qu'exercent ces deux structures de sortie sur les réseaux pré-moteurs du thalamus va donc se retrouver levée ce qui participe à l'initiation du mouvement par l'activation du cortex moteur (Bolam & Smith, 1990). La voie indirecte est formée des neurones qui projettent sur le GPe dont les neurones projettent à leur tour sur le STN. Les neurones de la voie indirecte expriment les récepteurs dopaminergique 2. La dopamine va conduire à l'inhibition des récepteur D2 des neurones exprimant permettant de lever l'inhibition du GPe, renforçant son effet inhibiteur sur le STN, diminuant ainsi l'excitation glutamatergique du STN sur les structures de sortie. Alors que la voie indirecte a une influence inhibitrice sur le mouvement, la dopamine induit une levée d'inhibition thalamique et corticale et favorise donc également l'élaboration du mouvement (Parent & Cicchetti, 1998).



**Figure 5 : Représentation simplifiée du schéma des ganglions de la base (GB).**

En condition physiologique (A) et dans le cadre de la MP (B). (Adapté de Vitek et al, 2019)



Néanmoins, afin de limiter les effets du déséquilibre des GB des mécanisme compensatoire sont mis en place et les symptômes moteurs caractéristiques de la MP n'apparaissent qu'après 70 à 80 % de dénervation au niveau du striatum.

Cependant, dans la phase précoce, bien que compensées, ces atteintes conduisent à d'autres type de symptômes, notamment d'ordre psychiatrique tel que l'apathie. Décrite pour la première fois dans le cadre de la MP par E.Brissaud qui rapporta des états d'indifférence et un manque de réaction chez des patients parkinsoniens (Prange et al., 2018), l'apathie a longtemps été considérée comme un simple symptôme de la dépression. Ce n'est qu'à partir des années 90 qu'elle a été reconnue comme un syndrome à part entière (Marin et al., 1991). Caractérisé par une perte de motivation s'exprimant aux niveaux, comportemental, cognitif et émotionnel, l'apathie se manifeste par :

- une diminution des comportements dirigés vers un but (baisse de la productivité, de l'effort, de l'initiative, de la persévérance, diminution de la socialisation, des loisirs, des projets).

- une diminution de la cognition orientée vers un but (manque d'intérêt général et pour son état personnel, diminution de la valeur attribuée aux relations sociales, aux loisirs, manque de curiosité).

- une diminution de l'émotion accompagnant les comportements dirigés vers un but (émoussement affectif, absence de réponse émotionnelle).

Bien qu'elle puisse être associée à la dépression (Kirsch-Darrow et al., 2006; Levy et al., 1998), l'apathie dans la MP s'exprime majoritairement seule et avec une prévalence allant jusqu'à 70 % selon les études considérées (Pedersen et al., 2009; Starkstein & Brockman, 2011), (Drijgers et al., 2010; Kirsch-Darrow et al., 2006). Elle diffère notamment de la dépression par l'absence de pensée négative ou suicidaire et de souffrance morale (Marin 1990).

Ainsi, l'apathie réduit de façon considérable la qualité de vie des patients et impacte sévèrement la vie des proches (Benito-León et al., 2012; Leiknes et al., 2010).

### 3. Phase avancée (Stade 4)

Au cours du stade 4, le processus synucléinopathique s'intensifie au sein des noyaux déjà atteints au stade 3. Par ailleurs, les noyaux intra-laminaires thalamiques antérieurs et postérieurs, qui se projettent sur le striatum et le cortex, commencent à être affectés. Ce

stade correspond également à une atteinte du cortex temporal antéromédian, zone impliquée dans le transfert des données des aires associatives sensorielles au cortex préfrontal via les entrées du système limbique. D'autre part, la déplétion des neurones dopaminergiques progresse et atteint maintenant les régions rostrale, dorsale et médiane de la SNc, conduisant à une dénervation striatale plus importante. C'est à ce moment-là, entre le troisième et le quatrième stade qu'apparaissent les premiers symptômes moteurs de la MP permettant son diagnostic (Figure 6).

Connus sous le nom de « triade motrice », l'akinésie, les tremblements de repos et la rigidité représentent les trois principaux symptômes moteurs de la MP (Samii et al., 2004).

L'akinésie est définie comme une lenteur et un manque de mouvements spontanés. Les patients éprouvent des difficultés avec les tâches motrices fines telle que boutonner une chemise, et présentent un changement d'élocution avec une voix calme et monotone (hypophonie), une augmentation de la salive en raison de déglutition peu fréquente, ou encore la perte de l'expression faciale (hypomimie). L'akinésie est le symptôme moteur le plus invalidant dans la MP et observable rapidement par le clinicien car asymétrique. Généralement elle conduit à la perte du balancement des bras chez le patient.

Les tremblements de repos « parkinsoniens » se caractérisent par des mouvements involontaires de très faible amplitude et à basse fréquence (4–6 Hz). Ils sont apparents dans la partie la plus distale d'un membre, le plus souvent dans la main si le membre supérieur est impliqué, mais ils peuvent également être observés dans les jambes, le menton ou la mâchoire. Ils se produisent lors des phases de repos ou d'inactivité et disparaissent lors d'une action volontaire.

La rigidité résulte d'une tension excessive des muscles qui les empêche de se détendre et de se relâcher durant un mouvement. Cette hypertonie impacte la fluidité des mouvements qui deviennent saccadés, on parle ainsi de phénomène de « roue dentée ». Affectant d'abord les membres supérieurs, elle se généralise ensuite pour conduire à l'apparition de troubles de la posture qui devient crispée, voutée en avant, la tête baissée.

Bien que les tremblements soient souvent identifiés comme une caractéristique clé de la MP par les cliniciens et le public, leur présence n'est pas obligatoire pour émettre un diagnostic de MP, qui s'appuie plutôt sur l'akinésie et la rigidité. D'ailleurs près de 10 % des patients parkinsoniens ne présenteront jamais de tremblement (Jankovic, 2008).

#### 4. Phase tardive (Stade 5 et 6)

Enfin, la phase tardive se caractérise par la propagation des agrégats d'alpha-synucléine à la quasi-totalité du cerveau. Ainsi, le stade 5 est défini comme le début de l'atteinte du néocortex et du cortex préfrontal (Pavese et al., 2011). A ce stade, la perte des neurones dopaminergiques est telle que la substance noire apparaît macroscopiquement pâle (Braak et al., 2003; Braak & del Tredici, 2008). Finalement, le stade 6 implique l'ensemble du néocortex et les zones sensorielles motrices et primaires.

Cette large atteinte du cortex se traduit cliniquement par l'apparition de démences. Avec une prévalence comprise entre 24 et 31 % des patients parkinsoniens (Aarsland et al., 2005), les démences apparaissent 10 à 15 ans après le diagnostic. Parmi elles, les plus fréquemment rencontrées sont les déficits cognitifs, l'affaiblissement de la mémoire, les difficultés à prêter attention et à traiter les informations. De plus, 20 % à 30 % des patients peuvent également présenter des hallucinations, le plus souvent d'ordre visuel (Diederich et al., 2009).

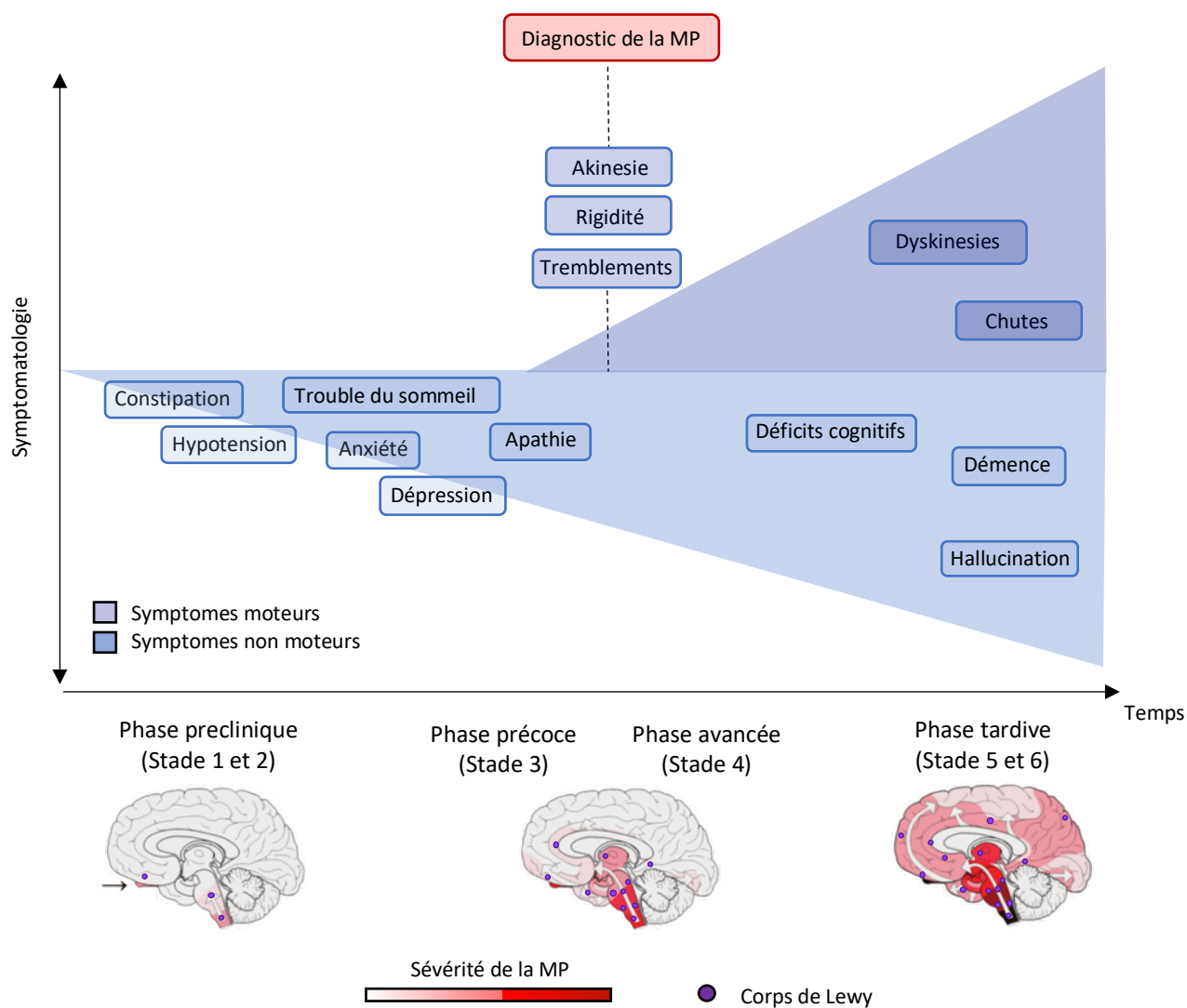
Le système de stratification de Braak, qui correspond de près à la classification originale des troubles liés aux corps de Lewy proposée par Kosaka et collaborateurs (Kosaka et al., 1988), est aujourd'hui largement validé et accepté (Braak et al., 2005; Dickson et al., 2010; Dijkstra et al., 2014; Kingsbury et al., 2010).

Néanmoins, ce système n'est adapté qu'aux patients dont la maladie débute jeune et est caractérisé par une progression lente, une durée longue et des symptômes principalement moteurs, la démence n'apparaissant seulement qu'à un stade très avancé. En effet, environ 15 % des malades parkinsoniens ne rentrent pas dans cette classification. Notamment, certains patients ne présentent pas d'atteinte du noyau dorsal du nerf vague, point de départ de l'hypothèse de Braak (Attems & Jellinger, 2008; Kalaitzakis et al., 2008), ni même de signes d'une progression rostrocaudale de la pathologie (Kalaitzakis et al., 2008; Zaccai et al., 2008). D'autre part, certains patients présentant une agrégation importante d'alpha-synucléine au niveau cérébral, n'exprime que peu ou pas de symptômes classiques de la MP (Parkkinen et al., 2008).

Les causes pour lesquelles certains patients ne répondent pas au schéma de progression de Braak ne sont pas connues et restent à élucider. De plus, cette classification se

base uniquement sur la propagation de l'agrégation d'alpha-synucléine, or, cette propagation apparaît comme étant faiblement corrélée avec la mort neuronale, une des caractéristiques majeures de la MP (Blesa et al., 2018; Surmeier et al., 2017).

Malgré ces réserves, l'hypothèse de Braak fait aujourd'hui consensus pour l'étude de la MP et des synucléinopathies associées, car elle décrit avec précision l'initiation et la progression de la maladie pour la majorité des cas diagnostiqués.



**Figure 6 : Caractéristiques anatomopathologiques et symptômes cliniques associés à la maladie de Parkinson au cours du temps**

L'apparition des symptômes moteurs permettant d'établir le diagnostic est précédée de plusieurs années par un éventail de symptômes non moteurs non spécifiques de la MP. Ces s'expriment tout au long de la maladie, à des degrés variables. (Adapté de Poewe et al, 2017)

## B. Approches thérapeutiques de la MP

Les traitements de la MP disponibles à ce jour ne sont malheureusement que symptomatiques, ne permettant pas de ralentir, atténuer ou stopper la progression de la maladie. Néanmoins plusieurs approches en cours de développement constituent un espoir pour la cure de la MP.

### 1. Thérapies à visée symptomatique

#### a. *Stratégies pharmacologiques*

Compte tenu du rôle central de la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans l'apparition des symptômes moteurs de la MP, les premières approches utilisées ont consisté à suppléer la dopamine manquante au niveau cérébrale.

#### i. *La L-DOPA*

Contrairement à la dopamine, son précurseur, la Levodopa (L-DOPA) est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique et constitue aujourd'hui la molécule de référence pour le traitement de la MP. Son utilisation en première intention permet une amélioration efficace des symptômes moteurs, particulièrement l'akinésie et la rigidité (Morgan & Fox, 2016).

Cependant, la prise de L-DOPA ne permet pas de ralentir ou de stopper le processus dégénératif. D'ailleurs, après plusieurs années de traitement, son efficacité diminue, donnant lieu à un échappement thérapeutique. Celui-ci se matérialise par des fluctuations motrices de type « on-off », accompagnées par des mouvements anormaux involontaires appelés dyskinésies (Calabresi et al., 2008; Vijayakumar & Jankovic, 2016) (Figure 7).

Bien que l'origine de ces dyskinésies L-DOPA induites ne soit pas encore totalement comprise, elles seraient principalement dues à deux phénomènes : 1) les prises répétées de L-DOPA engendrant une stimulation pulsatile des récepteurs dopaminergiques conduisant à leur hypersensibilisation (Albarran et al., 2014) ; 2) l'incapacité de la voie nigrostriée à stocker et convertir la L-Dopa en dopamine avec l'avancée du processus neurodégénératif. (Carta et al., 2007; Iravani et al., 2012).

Ainsi, une prise fragmentée ou l'utilisation de pompe permettant une libération prolongée et continue de L-DOPA et la stabilisation de sa concentration, ont montré leur

efficacité pour réduire ces fluctuations (Antonini et al., 2010). De plus, retarder l'introduction du traitement à la L-Dopa via l'utilisation d'autres molécules telles que les agonistes dopaminergiques, pourrait limiter ces effets secondaires et permettre de profiter le plus longtemps possible de son efficacité (Chung et al., 2018).

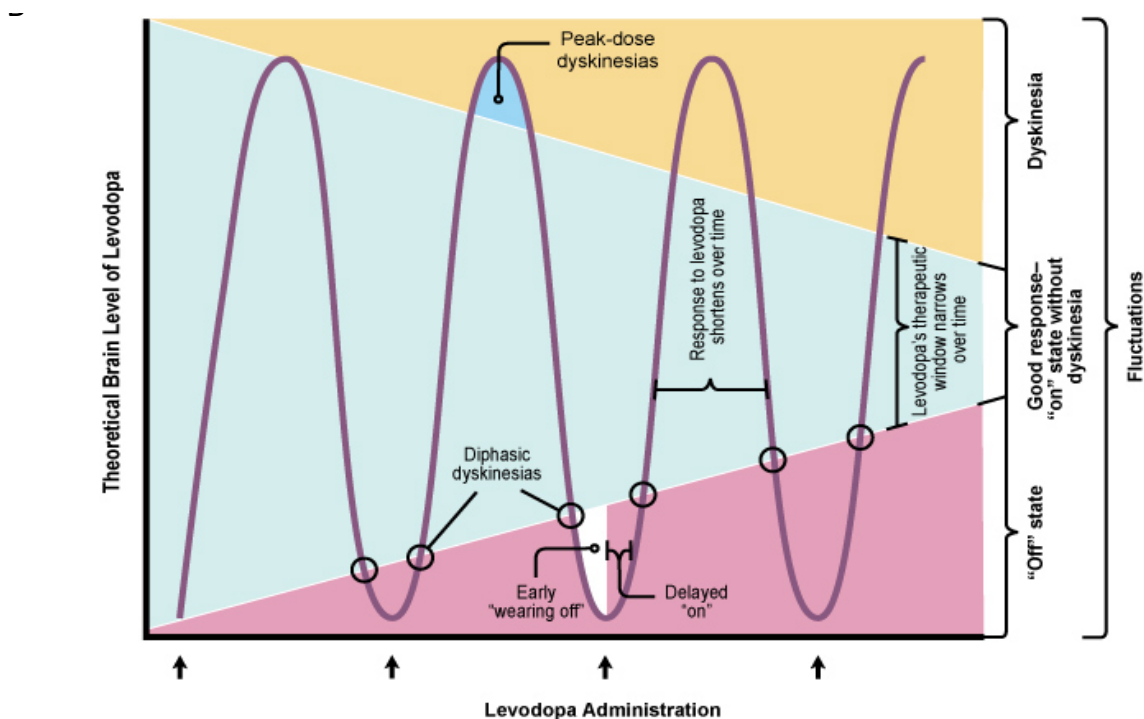
## *ii. Les agonistes dopaminergiques*

On distingue deux familles d'agonistes dopaminergiques en fonction de leur origine. Les agonistes issus de l'ergot de seigle, dit d'ancienne génération, comme par exemple la bromocriptine, possèdent une affinité pour les récepteurs dopaminergiques D2 mais également pour des récepteurs sérotoninergiques, ce qui leur confère une bonne efficacité mais provoque également l'apparition d'effets secondaires (Borovac, 2016). Afin de parer à ce manque de spécificité, des agonistes non issus de l'ergot, comme le Pramipexole, qui se lient de façon plus spécifique aux récepteurs dopaminergiques (D2/D3) ont été développés (Holloway et al., 2000; Reichmann et al., 2006).

Par ailleurs, les agonistes dopaminergiques ont une demi-vie plus importante que la L-Dopa, qui conduit à une stimulation dopaminergique plus stable, et permet donc d'éviter l'apparition de fluctuations motrices et de dyskinésies (Rascol et al., 2000; Stocchi, 2009). De plus, contrairement à la L-DOPA, ils n'ont pas besoin d'être convertis en dopamine et ne dépendent donc pas du nombre de neurones dopaminergiques restants (Samii et al., 2004).

Ainsi, ils sont souvent prescrits en première intention, en particulier chez les patients jeunes, afin de retarder la prise de L-Dopa (C.W. et al., 2009; Goldenberg, 2008). Ils peuvent également être prescrits en complément de celle-ci afin d'en réduire les doses et, donc de limiter ses effets secondaires (C.W. et al., 2009).

Cependant, sur le long terme, ils peuvent conduire au développement d'un groupe hétérogène d'effets secondaires appelés troubles du contrôle des impulsions. En effet, les agonistes dopaminergiques agissent chez les patients parkinsoniens comme des psychostimulants et provoquent ainsi l'apparition de stéréotypies, d'abus du traitement dopaminergique, ainsi que différents troubles impulsifs/compulsifs (achats compulsifs, jeu pathologique, hypersexualité...) (Atmaca, 2014; K. R. Chaudhuri & Schapira, 2009; Moore et al., 2014).



**Figure 7 : Effets secondaires de la pharmacothérapie pour la maladie de Parkinson.**

Modèle de la réponse motrice à la L-Dopa en fonction de sa concentration théorique dans le cerveau et de la progression de la maladie. (Source : <https://www.invigoratept.com/>)

### iii. Agents non dopaminergiques

La MP n'affectant pas uniquement le système dopaminergique, des agents pharmacologiques visant les systèmes glutamatergique, GABAergique, sérotoninergique, noradrénergique et cholinergique peuvent être préconisés en complément de la dopathérapie. Cette approche peut être intéressante pour traiter l'instabilité posturale ou le tremblement qui ne sont généralement que peu améliorés par la dopathérapie (Fox, 2013).

### b. Stratégie chirurgicale

L'échappement thérapeutique associé aux approches pharmacologiques a constitué un véritable défi pour les cliniciens, les conduisant à chercher de nouveaux outils thérapeutiques.

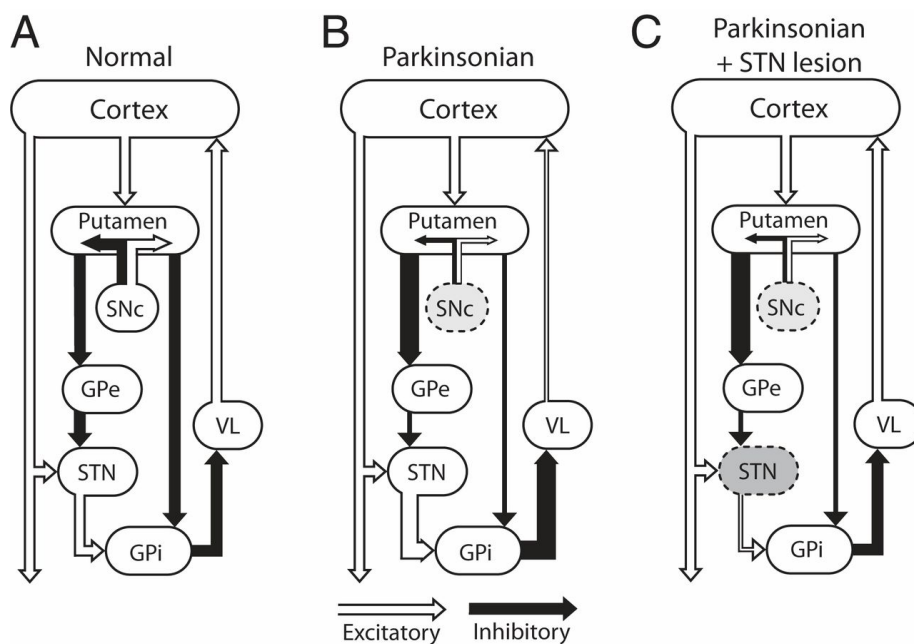
Dans la MP, la dégénérescence des neurones dopaminergiques entraîne l'apparition de symptômes moteurs via des dysfonctionnements importants au sein d'un ensemble de structures sous corticales, appelé les ganglions de la base (Parent & Hazrati, 1995; Turner & Desmurget, 2010).

Ainsi, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc engendre, au niveau de la voie indirecte, une forte inhibition du GPe entraînant une hyperactivité du NST résultant d'une diminution des mouvements (Parent & Hazrati, 1995).

Il a donc été proposé que l'inhibition du NST, noyau relai, puisse être efficace afin de limiter les effets de la dégénérescence et afin de gérer les symptômes moteurs associés. Ainsi, des premières approches lésionnelles unilatérales ont vu le jour chez le primate montrant de bons résultats sur les symptômes moteurs mais entraînant des mouvements anormaux des membres controlatéraux à la lésion (Bergman et al., 1990) (Figure 8).

Ainsi, une approche chirurgicale réversible, qui consiste à stimuler électriquement le NST, a été proposée. Les premiers travaux qui ont permis de montrer que la stimulation haute fréquence (SHF) du NST induisait une amélioration fonctionnelle spectaculaire des symptômes moteurs, similaire à celle observée après administration de L-DOPA, mais sans induire de fluctuation motrice et/ou de dyskinésies ont été réalisés chez le singe rendu parkinsonien (Benazzouz et al., 1996). Par la suite, le transfert de cette technique chez le patient a révélé des effets similaires rendant ainsi aux patients leur autonomie (Krack et al., 2003; Limousin et al., 1995, 1998). Bien qu'elle représente l'outil de référence pour pallier à l'échappement thérapeutique associé à la dopathérapie, la stimulation reste réservée aux patients de moins de 70 ans, toujours dopa-sensibles et présentant des fluctuations motrices. De plus, des études récentes chez l'animal ainsi que chez le patient ont reporté l'apparition d'effets secondaires indésirables associés à la SHF, notamment au niveau neuropsychiatriques qui pourrait être engendré à la fois par la stimulation ainsi que la diminution des traitements associé (Castrियो et al., 2014; Lhommée et al., 2012; Vachez et al., 2020). Néanmoins, le lien réel entre l'apparition de ces troubles et la SHF reste actuellement débattu : l'apparition de ces troubles du comportement est-elle liée à la diminution des traitements dopaminergiques, permise par l'efficacité de la SHF-NST, ou à un effet direct de la SHF-NST ? (Castrियो et al., 2014; Thobois et al., 2010).





**Figure 8 : Impacte de la SHF du NST dans le cadre de la MP. (Adapté de Vitek et al, 2019)**

## 2. Thérapies à visées préventive ou curative

Les stratégies décrites précédemment, et qui constituent actuellement les traitements de référence de la MP, sont uniquement symptomatiques. Si elles améliorent réellement les symptômes moteurs, elles peuvent aussi, sur le long terme, être à l'origine de complications importantes. Ainsi, parallèlement, des stratégies à visée curative basées notamment sur de la thérapie cellulaire, de la thérapie génique ou des approches pharmacologiques ont été envisagées, et sont, pour certaines, encore en cours de développement.

### a. Thérapie cellulaire dans la MP

La thérapie cellulaire, dont le principe repose sur la transplantation de cellules souches afin de remplacer les neurones dégénérés au sein des zones impactées par la MP, a été envisagée dès les années 80 (Bjořklund & Stenevi, 1979). A ce jour, les principaux types cellulaires qui ont été testés dans cette approche sont les cellules souches embryonnaires, les cellules souches neurales et les cellules souches mésenchymateuses.

Même si les premières études de greffes de cellules souches embryonnaires ont montré une amélioration des troubles moteurs chez l'animal et sur un petit nombre de

patients (pour revue voir Yang et al., 2011), ces résultats ont ensuite été nuancés par des études n'ayant pas montré d'efficacité, notamment chez les patients les plus âgés (Freed et al., 2001). En effet, malgré une majoration de la libération dopaminergique observée par imagerie fonctionnelle chez les patients greffés, aucun effet bénéfique n'a été mis en évidence sur les signes cliniques. De plus, des travaux reportent une transmission du processus dégénératif de l'hôte vers le greffon, y entraînant même l'apparition de corps de Lewy (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008). Malheureusement, l'utilisation d'autres sources de cellules souches, telles que les cellules neurales ou les cellules mésenchymateuses, a également conduit à des difficultés de transposition en clinique compte tenu respectivement des difficultés techniques liés à leur prélèvement, et de leur capacité de prolifération et de différenciation limitée (Jang et al., 2020; P. Jensen et al., 2011). Ainsi, les recherches actuelles se focalisent principalement sur d'autres sources de cellules avec un potentiel de prolifération et de différenciation plus important. En effet, les cellules souches pluripotentes induites, issues de cellules somatiques (fibroblaste par exemple), s'affranchissant donc des problèmes éthiques, présentent des caractéristiques moléculaires et morphologiques communes aux cellules souches embryonnaires et se différencient de manière similaire (Barker et al., 2017; Kikuchi et al., 2011). D'ailleurs, l'efficacité et la sécurité de la transplantation de ces cellules ont récemment été rapportées chez l'homme au travers de premiers résultats qui montrent après 18 mois, une stabilisation, voire une amélioration des symptômes moteurs et psychiatriques (Doi et al., 2020; Schweitzer et al., 2020). Même si des études supplémentaires sont nécessaires, ces résultats montrent que la thérapie cellulaire curative pourrait être proposée dans le futur aux patients atteints de la MP.

### *b. Thérapie génique dans la MP*

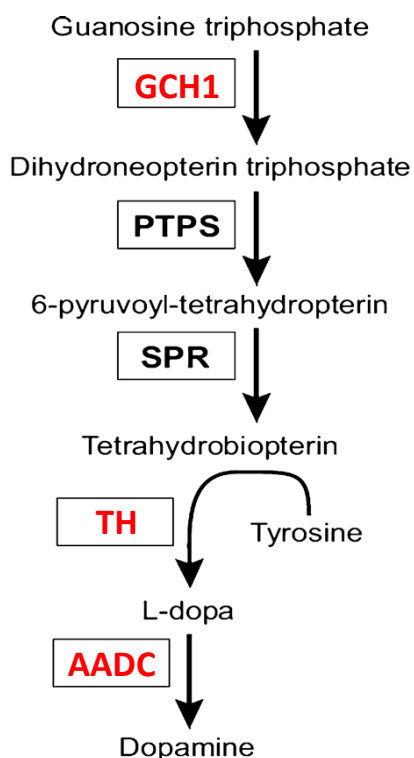
Au vu des difficultés de remplacement des neurones DA perdus, des stratégies de thérapie génique se sont développées.

Une première approche a consisté à tenter de limiter le processus dégénératif, voire de générer de la repousse axonale via l'utilisation de facteurs neurotrophiques, principalement le facteur dérivé de lignée cellulaire gliale (GDNF) ou son analogue la neururine ont été évalués chez l'animal notamment via des injections d'AAV. Il a été montré

que les effets bénéfiques du GDNF sur la voie nigrostriée étaient similaires que celui-ci soit injecté avant (Kirik et al., 2000), après (Rosenblad, 1999; Rosenblad et al., 1997), ou en même temps que la lésion DA (Rosenblad, 1999). Ces observations ont permis de mettre en lumière les propriétés neuroprotectrices et régénératrices du GDNF et donc sa potentielle application chez le patient *de novo*. Cependant, les premiers essais cliniques de libération locale de facteur neurotrophique induite par des AAV au sein de la voie nigro-striée, que ce soit le GDNF ou la neurturine, n'ont pas confirmé les effets bénéfiques observés chez l'animal chez les patients parkinsoniens (Sullivan & O'Keefe, 2016). Le GDNF s'est même révélé toxique chez 10 % des patients traités (Lang et al., 2006) (Marks et al., 2010; Warren Olanow et al., 2015).

À l'image de la SCP, une autre approche a visé à réduire l'hyperactivité du NST présente chez les patients parkinsoniens en augmentant localement la synthèse d'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), via l'injection d'AAV codant pour le gène de la glutamate décarboxylase (GAD), son enzyme de synthèse limitante. Bien que les études cliniques réalisées aient montré une amélioration des symptômes moteurs chez les patients traduit par une diminution moyenne de 23,1% du score UPDRS, celle-ci restait inférieure à celle obtenue grâce à la SHF, limitant ainsi les perspectives d'utilisation de cette nouvelle approche dont l'innocuité était par ailleurs moins connue (Kaplitt et al., 2007; LeWitt et al., 2011).

Ces dernières années, une nouvelle approche consistant à agir directement sur la voie de synthèse de la dopamine pour en rétablir une concentration striatale suffisante a eu un certain retentissement. La synthèse de dopamine repose sur l'action en cascade de la tyrosine hydroxylase (TH), son enzyme de synthèse limitante qui utilise comme co-facteur la guanosine triphosphate cyclohydrolase (GCH1), et de l'acide aminé décarboxylase (AADC) (Figure 9).



**Figure 9 :** La L-tyrosine est convertie en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase (TH) en utilisant le cofacteur tétrahydrobioptérine, dépendant de la GTP cyclohydroxylase 1 (GCH1). La L-DOPA est ensuite convertie en dopamine par l'acide aminé décarboxylase (AADC).

Ainsi, des essais cliniques permettant d'administrer au sein du striatum, un lentivirus contenant les gènes codant pour la TH, l'AADC et le GCH1 nommé Prosavin® ont été menés (Palfi et al., 2014). Débutés chez l'homme il y a moins de 10 ans, ils ont montré une amélioration des symptômes moteurs 12 mois après l'injection (Palfi et al., 2014). Cependant, le suivi longitudinal des premiers patients traités a montré qu'après 4 ans ces effets stagnent sur le long terme, avec l'avancement de la maladie (Palfi et al., 2018). Ceci peut facilement s'expliquer par le fait que, à l'instar de la L-Dopa, cette technique est dépendante des neurones dopaminergiques restants et qu'ils continuent à dégénérer au cours de la maladie.

Enfin, compte tenu du rôle pathogénique de l'alpha-synucléine dans la MP, plusieurs stratégies ciblant sa clairance ou son agrégation sont actuellement en cours de développement. Parmi elles, l'immunothérapie, qu'elle soit active, en induisant le développement d'une immunité contre l'alpha-synucléine via l'injection de vaccin tel que PD01 dans le projet Affitope®, ou passive, via l'injection directe d'anticorps dirigés contre l'alpha-synucléine, représente la stratégie la plus avancée (W. G. Meissner, 2018), les essais cliniques de phase II étant en cours (Jankovic, 2018; Schwab et al., 2020).

### *c. Approches pharmacologiques*

Parmi les agents curatifs envisagés, on peut citer les facteurs anti-apoptotiques et les molécules antioxydantes telles que le coenzyme Q10. Même si les essais précliniques sont encourageants, aucun de ces agents n'a montré de résultats probants chez le patient (Tarazi et al., 2014).

Par ailleurs, l'évaluation, sur une cohorte de plus de 1000 patients, de la supplémentation en créatine, afin de palier au déficit énergétique mitochondrial rencontré dans la MP (Anandhan, Jacome, et al., 2017) (voir chapitre 3 page 69), n'a pas montré d'efficacité supérieure à celle du placebo (Kieburz et al., 2015).

Enfin, ces dernières années, le faible taux d'incidence de la MP observées chez des patients diabétique traité avec des sensibilisateurs à l'insuline tels que les des thiazolidinédiones (TZD) en comparaison d'autres traitements (Brauer et al., 2015), a conduit à émettre l'hypothèse que ces molécules auraient un potentiel thérapeutique ou protecteur dans la MP. A ce jour, l'utilisation des TZD telle que la molécule MSDC-0160 en préclinique, a montré un ralentissement de la progression des troubles moteurs pouvant être lié à un effet neuroprotecteur de la molécule (Ghosh et al., 2016; Peelaerts et al., 2020).

En conclusion, même si des résultats prometteurs ont été obtenus ces dernières années, le frein majeur à la validation des différentes approches précitées repose sur l'application trop tardive de ces stratégies chez l'homme (Olanow et al., 2008; Stocchi, 2013). En effet, ces approches ne sont proposées qu'une fois le diagnostic établi, donc dans des phases où le processus dégénératif est déjà bien avancé, ce qui limite grandement leur intérêt (Manfredsson et al., 2020). Ces observations démontrent la complète nécessité de diagnostiquer la MP le plus précocement possible, afin de permettre une meilleure prise en charge des patients, mais également d'accéder à une fenêtre temporelle compatible au développement et à l'application de stratégies neuroprotectives et curatives (Kilzheimer et al., 2019)

## C. Le diagnostic de la MP

Actuellement, le diagnostic de la MP repose entièrement sur l'évaluation des signes cliniques moteurs, qui apparaissent alors que la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la SNc dépasse les 60-70%, entraînant une déplétion en dopamine d'environ 80 % au niveau du striatum (Mou et al., 2020). De plus, au-delà de son établissement tardif, le diagnostic de la MP est rendu difficile par l'existence de pathologies confondantes comme l'atrophie multi-systématisée (AMS) ou la paralysie supranucléaire progressive (PSP).

L'examen clinique qui permet d'établir le diagnostic et de suivre la progression de la maladie se base principalement sur l'utilisation d'échelles d'évaluation des symptômes et sur des techniques d'imagerie (Perlmutter, 2009).

Enfin, il est important de préciser qu'à ce jour, l'analyse post-mortem des cerveaux de patients rapportant la présence conjointe de corps de Lewy et de la dégénérescence du système dopaminergique mésencéphalique est le seul moyen de confirmer sans ambiguïté le diagnostic initial de la MP (Marsili et al., 2018).

### 1. Échelles diagnostiques

Historiquement, l'une des premières échelles qui a été développée fut celle de Hoehn et Yahr (Hoehn & Yahr, 1967), divisant la MP en 5 stades allant de la présence de signes unilatéraux entraînant un handicap fonctionnel minime ou nul (stade 1), jusqu'à l'utilisation de la chaise roulante, voire la perte totale d'autonomie (stade 5) (Figure 10). Bien que cette échelle repose sur un système de classification simple, elle est fiable et rapide d'utilisation et reste couramment utilisée en parallèle d'autres échelles pour décrire la progression des symptômes de la MP.

Stade	Manifestations cliniques
Stade 0	Aucun signe de la maladie
Stade 1	Signes unilatéraux n'entraînant pas de handicap dans la vie quotidienne
Stade 1,5	Atteinte unilatérale et atteinte axiale
Stade 2	Signes à prédominance unilatérale entraînant un certain handicap
Stade 2,5	Atteinte bilatérale légère à modérée ; une certaine instabilité posturale
Stade 3	Atteinte bilatérale avec une instabilité posturale ; malade autonome
Stade 4	Handicap sévère mais possibilité de marche ; perte partielle de l'autonomie
Stade 5	Malade en chaise roulante ou alité ; n'est plus autonome.

**Figure 10 : Stade d'évolution de la MP selon l'échelle de Hoehn et Yahr.**

Par la suite, l'amélioration des connaissances de la symptomatologie de la maladie a conduit au développement de nouvelles échelles multidimensionnelles. Parmi elles, l'*Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS), développée dans les années 80 afin de standardiser et d'homogénéiser les critères de diagnostic, qu'ils soient évalués par un expert ou non, se décompose en 4 sections. Ces dernières reposent sur des interrogatoires ou des observations cliniques évaluant notamment l'état mental, les activités de la vie quotidienne et les capacités motrices des patients. Aujourd'hui reconnue et utilisée mondialement, sa valeur prédictive, évaluée de manière rétrospective par l'intermédiaire d'analyses histologiques post-mortem, est d'environ 76 % (Hughes et al., 1992).

Néanmoins, succincte quant à l'évaluation des troubles non moteurs de la maladie qui peuvent apparaître dès les phases précoces et altérer la qualité de vie des patients autant que les troubles moteurs (K. R. Chaudhuri et al., 2006), son utilisation est souvent complétée par celle d'autres échelles telles que l'échelle d'Hamilton ou la PDQ39 qui permettent d'évaluer respectivement des comportements de type dépressif ou la qualité de vie des patients (Peto et al., 1998).

De plus, toujours dans un souci d'amélioration de la prise en compte de l'ensemble des symptômes de la maladie, l'UPDRS a été révisée en 2007 par la *Movement Disorder Society* (MDS) (Goetz, 2011). Cette nouvelle échelle, dénommée MDS-UPDRS, se compose de 4 parties

contenant chacune plusieurs items pouvant être notés de 0 (normal) à 4 (sévère) menant à score maximum de 272 (Annexe 1). Parmi elles, une partie entière est consacrée aux affections non motrices du quotidien (52 points).

Bien que cette version révisée n'améliore pas les performances du diagnostic, elle permet cependant une meilleure évaluation des signes moteurs et non moteurs, notamment sous traitement.

Plus récemment, la MDS a proposé de nouveaux critères diagnostiques pour la MP (Postuma et al., 2015).

La première étape consiste à rechercher la présence de signe en faveur d'un syndrome parkinsonien (lenteur plus raideur et/ou tremblement), suivi de la vérification de la présence de critères supplémentaires et de l'absence de critères d'exclusion et de signes de drapeaux rouges. (Annexe 2). Les premières évaluations multicentriques de cette méthode montrent, qu'elle permet de détecter des patients parkinsoniens avec une sensibilité et une spécificité de l'ordre de 95 % et 80 % respectivement (Postuma et al., 2018).

A ce jour, la MDS-UPDRS fait consensus et représente l'outil le plus utilisé pour l'évaluation de la MP. Néanmoins, le diagnostic reste tardif car il s'appuie principalement sur l'apparition des symptômes moteurs. En effet, une étude reporte une précision du diagnostic croissante avec l'avancée de la MP passant de 53% à 88% lorsque les symptômes sont présents depuis plus de 5 ans (Adler et al., 2014). De plus, des problèmes de spécificité persiste par rapport aux maladies confondantes que nous avons abordées. Pour tenter de pallier ce problème, des examens complémentaires aux analyses motrices, reposant notamment sur des méthodes d'imagerie peuvent être proposés.



## 2. Méthodes d'imageries

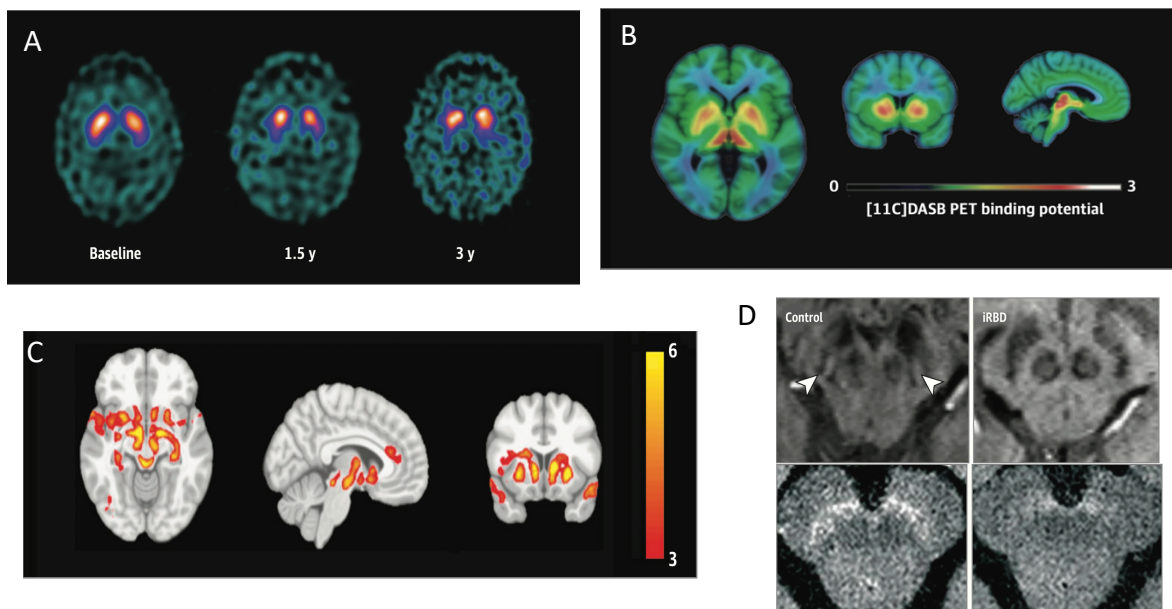
Les techniques d'imagerie, qui connaissent des progrès constants depuis plusieurs années sont un outil diagnostique robuste mais également un instrument de recherche fondamentale, permettant d'accéder à la physiopathologie de la maladie. En pratique clinique, l'imagerie de la MP repose principalement sur deux approches : la tomographie par émission de positon (TEP) et la tomographie par émission monophotonique (SPECT ou DaTscan). Elles permettent de mettre notamment en évidence une diminution de l'activité de l'AADC, reflet indirect de la capacité de synthèse de la dopamine (TEP), ou une diminution des sites de recapture présynaptique de la dopamine (DAT) au niveau striatal, illustrant la dénervation dopaminergique (DaTscan) (Figure 11A). Ce dernier présente donc l'intérêt d'affirmer ou d'infirmer la présence d'une dégénérescence dopaminergique, et potentiellement de manière très précoce, comme illustré chez des patients souffrant de trouble du sommeil (Chougar et al., 2020; Prange & Thobois, 2020; Thobois et al., 2014). Si leur spécificité est souvent excellente (autour de 98 %), elle ne permet pas de discriminer la MP de syndromes parkinsoniens neurodégénératifs (Mitchell et al., 2021).

Des approches similaires ont été développées pour les systèmes sérotoninergique et cholinergique qui sont tous deux impactés dans la MP, mais ils se confrontent aux mêmes limitations (Koga et al., 2015a; Miki et al., 2021a) (Figure 11B).

A l'inverse, l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) occupe une place de choix pour ce diagnostic différentiel entre MP et maladie confondante puisqu'il doit se révéler sans particularité dans le cadre de la MP. Ainsi, bien que les méthodes d'imageries permettent de lever le doute sur certains cas atypiques, elles ne peuvent en aucun cas remplacer l'examen clinique (Südmeyer et al., 2011).

Finalement, d'autres approches d'IRM, pour le moment réservées uniquement à la recherche, permettent de visualiser des anomalies morphologiques de la SNc et des zones d'atrophie notamment au niveau cortical, ce qui faciliterais le diagnostic différentiel de la MP par rapport à la PSP et la MSA avec une grande spécificité (Chougar et al., 2021) (Figure 11C). De plus, des séquences d'IRM sensible au fer, qui se retrouve en grande quantité dans le cerveau des patients atteints de la MP dès les stades précoces, ou à la neuromélanine, qui constitue un des éléments principaux des neurones dopaminergiques de la SNc, sont en cours

de développement et permettraient un diagnostic plus précoce de la maladie (de Marzi et al., 2016; Martin et al., 2008; Sjöström et al., 2017). (Figure 11D-E)



**Figure 11 : Exemple des méthodes d'imagerie utilisée pour le diagnostic de la MP.**

(A) Imagerie par tomographie d'émission monophotonique (SPECT) chez des témoins et des personnes atteintes de la MP à un stade précoce, modéré et avancé. (B) Imagerie de la DASB, ligand sérotoninergique par tomographie par émission de positons (TEP) chez des témoins et des personnes atteintes de MP à un stade précoce ou avancé. (C) IRM montrant la distribution de l'atrophie chez un patient atteint de la MP (D) Imagerie sensible à la neuromélanine chez un témoin sain et un patient atteint de la MP au stade modéré. (E) IRM sensible au fer chez un patient souffrant de signe avant-coureur de la MP. (Adapté de Mitchell et al., 2021)

Bien que les méthodes d'imagerie en cours de développement semblent avoir un fort potentiel pour le diagnostic précoce et spécifique de la MP par rapport aux maladies confondantes, ces approches restent lourdes et coûteuses, les rendant peu adaptées à une application clinique et systématique sur un grand nombre de patients et encore moins dans la phase prodromale.

En résumé, l'amélioration permanente des échelles cliniques et des différentes méthodes d'imagerie permet aujourd'hui de diagnostiquer la maladie dans environ 90 % des cas avec un taux d'erreur d'environ 20 % (Rizzo et al., 2016). Néanmoins, le diagnostic reste tardif et limite la prise en charge des patients ainsi que le développement de thérapie à visée curative. Il apparaît donc nécessaire de développer des outils diagnostic facilement utilisables

dès les phases précoces de la MP, avant même l'apparition des symptômes moteurs, permettant d'orienter les patients dans un second temps vers des méthodes plus lourdes et coûteuses telles que l'imagerie par exemple. Pour ce faire, l'utilisation de modèles animaux permettant de mimer les différentes phases de la MP, dont la phase prodromale, se révèle indispensable.





## Chapitre 2 : Les modèles animaux de la maladie de Parkinson

Le développement de modèles animaux s'est avéré indispensable pour étudier l'étiologie et la physiopathologie de la MP, mais également afin de pouvoir évaluer les effets de différents types de traitements.

Un bon modèle animal de la MP doit présenter une lésion de la voie nigro-striée, doit être reproductible, et ne doit pas induire des altérations des fonctions vitales trop importantes afin d'éviter des hauts taux de mortalité. Les premiers modèles développés reposent sur l'utilisation de neurotoxines telles que la 6-OHDA chez le rat et le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) chez la souris et le primate non-humain. Par ailleurs, l'identification de mutations génétiques dans certaines formes familiales de la MP a conduit au développement de modèles animaux transgéniques tels que le modèle A53T- $\alpha$ -synucléine.

Le développement de modèles animaux pertinent reste actif, notamment via l'utilisation de diverses neurotoxines, telles que les pesticides et herbicides (paraquat, roténone), reconnus comme facteurs de risque de la MP même si leur caractérisation reste faible à ce jour (Berry et al., 2010; Bonnef-Barkay et al., 2005; Kamel, 2013; Xiong et al., 2012).

Dans ce chapitre j'évoquerais en détails les modèles animaux qui ont été utilisés dans le cadre de ma thèse à savoir : le rat 6-OHDA, le primate non humain MPTP, et le rat alpha-synucléine.

### A. Modèles neurotoxiques

#### 1. La 6-OHDA

La 6-OHDA a été le premier agent neurotoxique, spécifique des neurones catécholaminergiques, utilisé pour reproduire les symptômes moteurs caractéristiques de la MP chez l'animal (Ungerstedt, 1968). La 6-OHDA ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) et doit donc être administrée directement en intracérébrale dans les zones d'intérêts, afin d'induire la dégénérescence. Cette neurotoxine pénètre dans les neurones dopaminergiques et noradrénergiques par des transporteurs de recapture des monoamines, ce qui rend les lésions non spécifiques (Figure 12). Par conséquent, une solution contenant des inhibiteurs sélectifs de la recapture noradrénergique (ex : la désipramine) est

souvent injectée en parallèle pour limiter la dégénérescence aux neurones dopaminergiques (Bové & Perier, 2012; Drui et al., 2014). Une fois internalisée au sein des neurones, la 6-OHDA induit la mort cellulaire par stress oxydatif en inhibant le complexe I de la chaîne mitochondriale et en produisant des espèces réactives de l'oxygène (Rodriguez-Pallares et al., 2007; Schober, 2004).

Initialement injectée bilatéralement au niveau de la SNc afin d'induire une perte sévère voire totale des neurones dopaminergiques, elle a permis de mettre en évidence une symptomatologie mimant la MP, avec notamment la présence d'akinésie et de catalepsie. Néanmoins, ces niveaux de lésion ont été également associés à la présence d'une adipsie et d'une aphasie sévère, provoquant une perte de poids importante des animaux pouvant mener à leur mort, ce qui a conduit à limiter l'usage de ce type de lésion (Campos et al., 2013; Eskow Jaunarajs et al., 2012). Par la suite, les injections unilatérales dans la SNc ou le faisceau médian du télencéphale (MFB) lui ont été préférées car elles entraînent l'apparition d'une akinésie et d'une rigidité des membres controlatéraux à la lésion, ainsi que d'une rotation suite à l'injection d'agents dopaminergiques comme l'apomorphine (Bezard et al., 1998; Tieu, 2011).

Bien que plus simple, cette perte unilatérale ne représente pas l'entière de la physiopathologie ainsi que la symptomatologie de la MP. En effet, ces modèles sont essentiellement utilisés pour l'étude des affections motrices et donc des phases avancées de la MP (Masini et al., 2021).

Ainsi, afin d'étudier les autres phases de la MP et les affections associées, des modèles de lésions partielles bilatérales ont été développés. Ainsi, l'utilisation de plus faible dose de 6-OHDA entraîne l'apparition de symptômes non moteurs caractéristiques, entre autres, des phases précoces de la MP tel que l'apathie, l'anxiété et la dépression (Drui et al., 2014; Favier et al., 2017). De plus, dans ce modèle, l'administration de traitement classiquement utilisé en clinique comme le pramipexole ou la L-dopa corrige permettent de corriger ces troubles lui donnant ainsi une bonne valeur prédictive (Drui et al., 2014; Favier et al., 2014).

De par son isomorphisme, sa validité prédictive et sa facilité d'utilisation, le modèle rat 6-OHDA a permis de multiples avancées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MP et dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques ou de neuroprotection (Favier et al., 2014, 2017; Kirik et al., 2000; Ximenes et al., 2015). Cependant, malgré tous ses avantages, ce modèle possède également des limites car il ne reproduit pas

le caractère progressif de la dégénérescence, ni l'accumulation de corps de Lewy caractéristique de la MP (Decressac et al., 2012).

## 2. Le MPTP

Le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) a été découvert en 1976, lorsqu'un groupe de jeunes Californiens en consommèrent par erreur et développèrent tous des symptômes moteurs sévères et similaires à ceux observés dans la MP (Davis et al., 1979; William Langston et al., 1983). Par la suite, l'examen post-mortem de leurs cerveaux révéla une perte des neurones DA au niveau de la SNc (Davis et al., 1979; Langston et al., 1999). Il fut alors proposé d'utiliser cette neurotoxine chez l'animal (William Langston et al., 1984). Cette neurotoxine présente l'avantage de passer facilement la BHE et peut donc être administrée par voie systémique.

Après avoir passé la BHE, le MPTP est transformé en 1-méthyl-4-phényl-1,2-dihydropyridinium (MPDP+) par la monoamine oxydase B (MAO-B) au niveau des astrocytes (Chiba et al., 1984; Markey et al., 1984). Le MPDP+ s'oxyde ensuite spontanément en 1-méthyl-4-phénylpyridine (MPP+) qui est toxique (Castagnoli et al., 1985). Une fois relégué par les cellules gliales, le MPP+, tout comme la 6-OHDA, est capté par les transporteurs dopaminergiques, internalisé au sein des neurones dopaminergiques et conduit à la mort neuronale via des processus similaires à ceux de la 6-OHDA (Figure 12).

Compte tenu de son administration systémique, l'intoxication au MPTP est utilisée dans de nombreuses espèces telles que la souris, le singe, le chien, le chat (Bezard et al., 1998; Graham et al., 2018; Y. Lu et al., 2018; Z. Lu et al., 2014). Il est intéressant de noter que, pour des doses comparables, l'administration de MPTP par voie systémique chez le rat ne produit pas de dégénérescence dopaminergique. Cette résistance serait due notamment à la quantité importante de MAO-B périphérique qui transformerait le MPTP en MPDP+ avant même qu'il ne passe la BHE (Giovanni et al., 1994; Schmidt & Ferger, 2001).

A l'instar de la 6-OHDA, il a été montré que le MPTP entraîne une perte rapide et importante des neurones dopaminergiques (Bezard et al., 1998). Néanmoins, de nouveaux protocoles, basés sur des injections de doses plus faibles mais répétées, ont été mis en place afin d'entraîner une perte progressive des neurones et ainsi mimer la progression du



processus neurodégénératif caractéristique de la MP (Ballanger et al., 2016; Fox & Brotchie, 2010; Muñoz-Manchado et al., 2016). Chez le primate non-humain, l'injection de MPTP entraîne des symptômes très proches de ceux observés chez les patients d'un point de vue moteur, tels que la bradykinésie, évoluant souvent en akinésie, la rigidité, et quelques fois des tremblements (Bezard et al., 1997; Bezard & Przedborski, 2011; W. Meissner et al., 2003; Przedborski et al., 2001). Aussi, il a été montré dans ce modèle l'apparition de symptômes non moteurs tels que les troubles du sommeil ou encore des atteintes cognitives (Barraud et al., 2009; Schneider & Pope-Coleman, 1995). Par ailleurs, ces troubles peuvent être corrigés par l'administration de traitement tel que la L-dopa ou des agonistes dopaminergiques (Veyres et al., 2018).

Ainsi, tout comme les modèles 6-OHDA, les modèles MPTP possèdent un bon isomorphisme et une bonne valeur prédictive. Cependant, à l'image du modèle 6-OHDA, le MPTP n'induit que rarement la formation de corps de Lewy (Fornai et al., 2005; Forno et al., 1986; Mustapha & Taib, 2021). Néanmoins, compte tenu de la possibilité d'obtenir un syndrome progressif chez le primate non-humain traité au MPTP et de la proximité anatomo-fonctionnelle entre le singe et l'homme, ce modèle reste particulièrement adapté pour étudier les différentes phases de la MP, ainsi que pour le développement de nouveaux traitements et de nouvelles thérapies (Jarraya et al., 2009; Vermilyea & Emborg, 2018). Cependant, il est important de noter, notamment chez le primate, que la mise en place de ce modèle est plus complexe à mettre en place que le rat 6-OHDA.

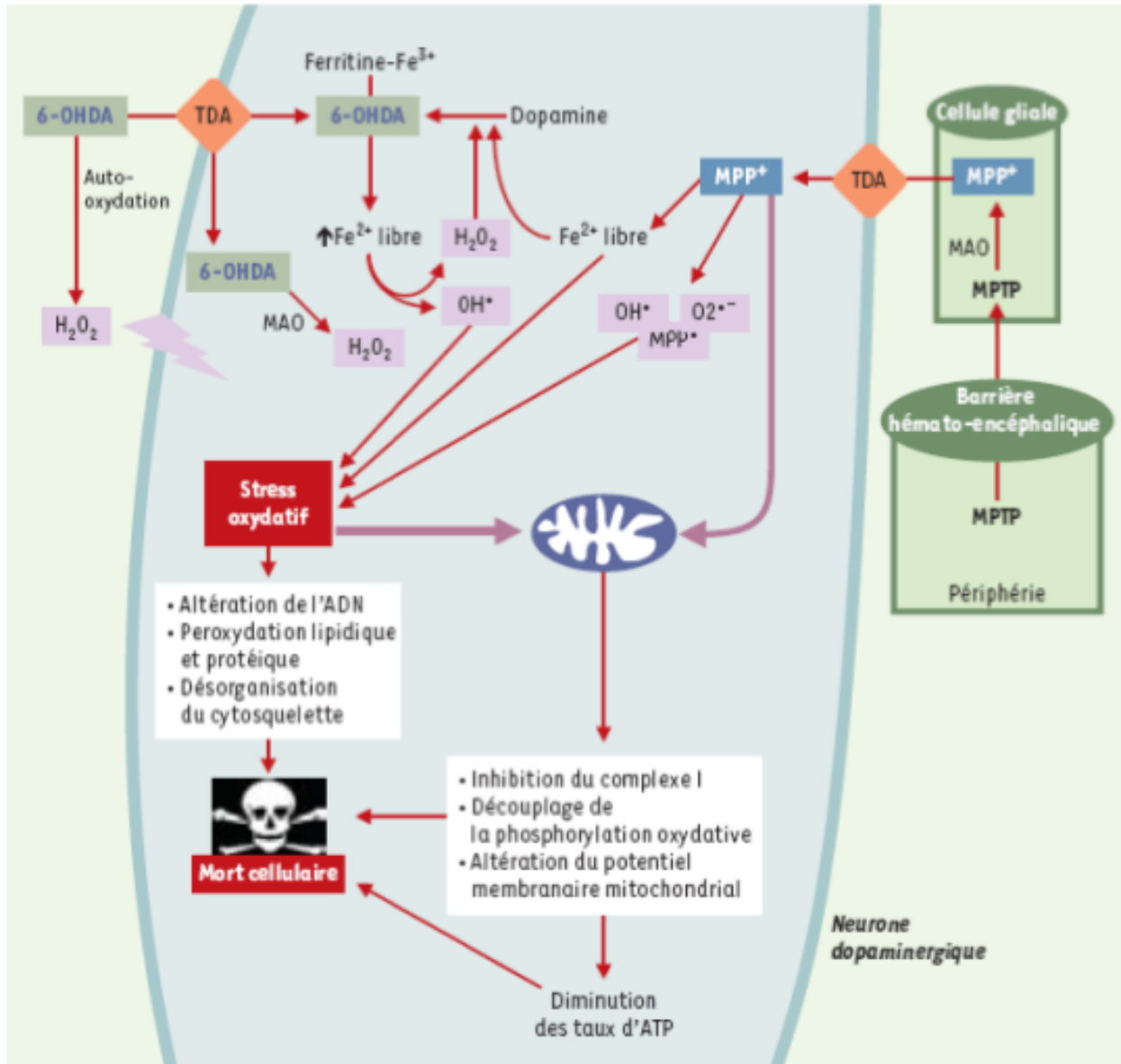


Figure 12 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la neurotoxicité de la 6-OHDA et du MPP<sup>+</sup> (Adapté de Lambeng et al., 2002).

## B. Modèles génétiques

### 1. Animaux transgéniques inspirés de forme monogénique

D'autres modèles se basent sur les modifications génétiques rencontrées dans les formes familiales de la MP. Les premières mutations mises en avant fut celles observées dans le gène SNCA codant pour l'alpha-synucléine (mutations A53T, A30P, E46K, H50Q et G52D) (Polymeropoulos et al., 1997). Suite à cette découverte, plusieurs autres gènes liés à la MP ont été identifiés tels que parkin, DJ-1, PINK1 et LRRK2 (Cookson, 2012; Selvaraj & Piramanayagam, 2019). Ainsi, la suppression complète du gène PINK1 chez la souris (souris KO) conduit à une diminution de la libération striatale de dopamine (Kitada et al., 2007), uniquement chez les animaux âgés, ce qui est intéressant compte tenu du fait que la MP est une maladie liée à l'âge. Des résultats similaires sont observés avec une invalidation des gènes LRRK2, Parkin et DJ1 (Sanchez et al., 2014). Cependant, malgré la présence de symptômes moteurs chez ces animaux, la perte neuronale est souvent plus faible que celle observée dans la MP (inférieur à 50 %) (Creed & Goldberg, 2018; Sanchez et al., 2014). En revanche, transposés chez le rat, les modèles génétiques reproduisent bien la symptomatologie caractéristique de la MP ainsi que le caractère progressif de la neurodégénérescence (Creed & Goldberg, 2018), ce qui les rend pertinents pour l'étude de la phase prodromale de la MP ou encore pour la mise au point de stratégies neuroprotectrices.

Cependant, ces modèles ne reproduisent pas l'ensemble des marqueurs de la MP et notamment la présence de corps de Lewy. Ces mécanismes physiopathologiques étant peu présent dans les modèles animaux, ils ont fait l'objet de modèle à part entière notamment basée sur l'accumulation d'alpha-synucléine permettant un nouvel essor des modèles génétiques.

### 2. Animaux transgénique basés sur la surexpression d'alpha-synucléine

En effet, le développement de lignées mutantes chez la souris ont montré que l'accumulation d'alpha-synucléine s'accompagne d'une diminution de la DA striatale, de la formation de corps de Lewy et en fonction des lignées de troubles moteurs (Giasson et al.,

2002; Masliah et al., 2000; Thiruchelvam et al., 2004) mais pas de la dégénérescence significative des neurones de la voie nigrostriée (Fernagut & Chesselet, 2004; Jagmag et al., 2016). Ces modèles mutants ne reproduisant pas l'anatomo-physiopathologie caractéristique de la MP, d'autres modèles basés sur l'administration exogène de la protéine mutée ont donc été développés.

Parmi les différentes stratégies testées, l'injection bilatérale au sein de la SNc d'AAV induisant la surexpression d'alpha-synucléine a permis d'induire la mort progressive des neurones dopaminergiques et une perte des terminaisons dopaminergiques striatales chez le rongeur rat (Bourdenx et al., 2015; Caudal et al., 2015; Ip et al., 2017) permettant ainsi d'étudier les différentes phases de la maladie chez un même animal (Oliveras-Salvá et al., 2013). En fonction de la forme d'alpha-synucléine utilisée (forme sauvage ou A53T mutée), la perte des neurones dopaminergiques au niveau de la SNc est en moyenne de 57 % et 51 % après 4 semaines et de 82 % et 60 % après 10 semaines d'expression du vecteur, respectivement pour le type sauvage et la forme A53T mutée (Ip et al., 2017; J. Lu et al., 2015).

Compte tenu du caractère progressive du processus dégénératif, les premières manifestations comportementales observées dans ce modèle se traduisent par l'apparition après 3 semaines de symptômes non moteurs, comme la dépression ou l'anxiété (Caudal et al., 2015; Petit et al., 2013), suivies par l'expression d'altérations motrices 10 semaines après l'injection, mimant ainsi des phases plus avancées de la maladie (Bourdenx et al., 2015; Caudal et al., 2015; Decressac et al., 2012; Ip et al., 2017; Oliveras-Salvá et al., 2013).

Plus récemment, d'autres approches se sont attachées à étudier la propagation de l'alpha-synucléine via l'administration intracérébrale ou systémique de fibrilles préformées (PFF) d'alpha-synucléine (Patterson et al., 2019). A l'instar de l'utilisation d'AAV il entraîne une dégénérescence progressive et l'apparition de symptômes moteur et non moteurs après plusieurs mois (S. Kim et al., 2019; Patterson et al., 2019; Paumier et al., 2015; Shimozawa et al., 2017). De façon intéressante il permettrait également d'illustrer l'hypothèse de Braak exposée dans le chapitre 1, selon laquelle la MP est initiée en périphérie du système nerveux central. En effet, l'injection de PFF d'alpha-synucléine au niveau intestinal produit l'agrégation d'alpha-synucléine et une dégénérescence progressive significative des neurones dopaminergiques au niveau de la SNc, qui s'accompagne de symptômes moteurs et non moteurs caractéristiques de la MP, tels que des affections psychiatrique (Kim et al., 2019).

Développé très récemment, ce modèle fait encore l'objet d'absence de consensus pour le protocole d'utilisation des PFF d'alpha-synucléine ce qui engendre des phénotypes relativement variables en fonction des protocoles (Polinski, 2021).

Pour résumer, les modèles génétiques ciblant l'alpha-synucléine présentent l'avantage majeur d'entraîner un développement progressif de la MP permettant ainsi l'étude des différentes phases de la maladie au sein d'un même animal. Cependant, compte tenu de leur mise en œuvre complexe, ils peuvent présenter une plus grande variabilité phénotypique d'une étude à l'autre.

Malgré leur intérêt incontestable dans l'amélioration de la compréhension de la physiopathologie de la MP pris individuellement, aucun des modèles animaux décrits ci-dessus ne reproduit parfaitement la neuropathologie ou la totalité des symptômes de la MP. Ainsi, afin de mieux couvrir la physiopathologie de la MP et d'utiliser en parallèle plusieurs d'entre eux qui sont complémentaire. En effet, croiser les résultats de plusieurs modèles et plusieurs espèces ou souches permet de résumer à la fois les facteurs environnementaux, génétique et la variabilité interindividuelle (Barker & Björklund, 2020). D'ailleurs, de manière intéressante, cette hétérogénéité est également présente chez les patients parkinsoniens, et peut aisément s'expliquer par les différents niveaux de dégénérescence du système dopaminergique ainsi que les différentes atteintes multisystémiques.

Ainsi, dans le cadre de cette thèse (pour l'étude 1) nous avons mis en parallèle le modèle rat 6-OHDA pour sa facilité d'utilisation et son bon isomorphisme, le modèle rat alpha-synucléine permettant de reproduire une dégénérescence progressive et le modèle primate non humain MPTP présentant une plus forte homologie avec l'homme que le rongeur.





## Chapitre 3 : La métabolomique par RMN comme outil d'analyse du métabolisme, et de recherche de biomarqueurs pour la maladie de Parkinson

### A. La métabolomique

#### 1. Définition

La métabolomique est l'analyse du métabolome, qui correspond à l'ensemble des métabolites présents dans les systèmes biologiques, que ce soit des cellules, du tissu ou des biofluides issus de modèles animaux ou de sujets humains. Les métabolites représentent une famille très hétérogène de composés biochimiques, dont le point commun principal est leur masse. En effet, ce sont des petites molécules, de poids moléculaire <1000 Da, telles que les acides carboxyliques, les alcools, les acides aminés, les glucides et les lipides, issues de toutes les voies métaboliques exprimées dans la cellule (Nicholson et al., 2002; Wishart et al., 2013). Les métabolites sont les produits finaux de l'expression des gènes, et peuvent également refléter l'impact d'un stress environnemental ou du style de vie (Johnson & Gonzalez, 2012; Sumner et al., 2003). Par conséquent, ils fournissent des informations essentielles pour la compréhension des phénotypes biologiques et pour étudier des mécanismes endogènes ou exogènes. Au cours de la dernière décennie, la métabolomique a connu des avancées technologiques significatives, en termes d'analyse, de traitement statistique des données et d'interprétation.

Concernant la RMN, les équipements, issus de la chimie analytique, permettaient d'analyser les métabolites bien avant que le terme de « métabolomique » n'apparaisse, mais c'est l'application de méthodes statistiques multivariées qui a totalement modifié le traitement et l'analyse des données, permettant de classer l'information selon son importance dans la question étudiée et donc d'identifier des biomarqueurs potentiels. Cela a permis d'aborder l'étude du métabolisme sans hypothèse à priori, au même titre que la génomique, transcriptomique et protéomique, faisant de la métabolomique la dernière des « omics » (Sumner et al., 2003). En effet, la métabolomique repose sur un traitement statistique global des données issues de différents échantillons afin de générer des empreintes métaboliques spécifiques (d'une pathologie, d'un stress, etc....). La comparaison



de ces empreintes permettra ainsi la mise en lumière de similitudes ou de différences entre les groupes étudiés. C'est pourquoi les applications de la métabolomique se sont rapidement et simultanément développées dans de nombreux domaines de recherche, par exemple en toxicologie, agroalimentaire, pharmacologie et en recherche biomédicale (Wishart, 2016; Q. Yang et al., 2019).

La métabolomique permet à la fois, dans un objectif de recherche fondamentale, de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans une pathologie, mais aussi, dans un objectif de recherche clinique, d'améliorer le diagnostic et/ou pronostic de cette pathologie (Q. Yang et al., 2019). Un point important est qu'il est maintenant reconnu qu'un biomarqueur peut être un profil métabolique global ou une combinaison de différents métabolites (ou transcripts/proteines...) ou de différents marqueurs issus des sciences « omics ».

En raison de l'abondance des métabolites, de leurs diversités chimiques, ainsi que de la grande plage de variation de leur concentration, il n'existe pas de méthode analytique standard permettant de couvrir tout le métabolome. Actuellement, les études en métabolomique sont réalisées principalement avec deux méthodes analytiques : la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (SM), seules ou associées.

## 2. Méthodes d'analyses

### *a. La spectrométrie de masse*

La SM permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêts par la mesure de leur masse moléculaire et l'étude de leurs processus de fragmentation. Cette technique est basée sur l'ionisation puis la séparation en phase gazeuse des molécules selon leur rapport masse/charge. Étant donné que les métabolites sont une famille de composés extrêmement hétérogènes, il n'existe pas de méthode unique d'extraction et de séparation des composés. Ainsi, la SM peut être couplée à d'autres techniques de séparation telles que la chromatographie gazeuse (GC) et la chromatographie liquide (LC). Le recours à de telles méthodes permet la séparation des métabolites selon leurs propriétés physico-chimiques et augmente la sensibilité et la résolution de la SM (Monteiro et al., 2013). Néanmoins, elles

nécessitent le plus souvent des étapes de préparation d'échantillons, ainsi que des étapes intermédiaires, qui peuvent représenter de potentielles sources de biais expérimentaux affectant sa reproductibilité.

### *b. La résonance magnétique nucléaire*

La RMN est une méthode d'analyse non sélective, permettant ainsi d'analyser simultanément l'intégralité des métabolites présents dans un échantillon à des concentrations supérieures à la limite de détection, c'est-à-dire de l'ordre du micro molaire. La RMN ne nécessite pas ou peu de préparation des échantillons, et est non destructive, permettant la conservation des échantillons dans un but de traçabilité, ou leur réutilisation pour d'autres analyses. Plusieurs noyaux présents dans toutes les molécules biologiques peuvent être analysés, en fonction de la problématique posée. Le plus couramment utilisé est le proton  $^1\text{H}$ . Il est facilement mesurable car il est le plus sensible de tous les noyaux, et il est présent dans tous les composés organiques permettant de refléter la composition quasi-complète de l'échantillon biologique étudié. Le carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) est l'isotope observable du carbone. Bien que très peu sensible en abondance naturelle (1% du carbone), il est couramment utilisé pour l'étude du métabolisme énergétique, principalement pour les études de flux métaboliques via l'utilisation de substrats marqués au  $^{13}\text{C}$  tels que le pyruvate ou le lactate. Enfin, le phosphore 31 ( $^{31}\text{P}$ ) permet la détection des phospholipides et des navettes énergétiques comme l'ATP, mais avec une plus faible sensibilité. Ainsi, la RMN du proton est largement la plus utilisée pour la métabolomique, principalement pour sa grande sensibilité et sa facilité d'utilisation, permettant par exemple une analyse d'échantillons de sérum en 10 à 15 minutes. De plus, la RMN présente l'avantage d'être intrinsèquement quantitative puisque l'aire des pics est directement corrélée à la concentration des noyaux observés, donc à la concentration du métabolite. La quantification peut donc être réalisée à partir d'un standard de concentration connue. Cependant, la quantification absolue nécessite de respecter un certain nombre de paramètres qui allongent le temps d'acquisition, ce qui n'est pas toujours possible de réaliser en métabolomique (Markley et al., 2017). Enfin, un autre avantage de la RMN réside dans sa très grande reproductibilité, notamment entre différents utilisateurs et même entre différents instruments (Dumas et al., 2006). Cela facilite grandement la réalisation d'études

multi-centriques qui sont cruciales pour le développement d'un biomarqueur en clinique (A.-H. M. Emwas, 2015a).

La RMN peut s'appliquer également à des échantillons non liquides hétérogènes « mous » comme des biopsies, sans extraction des métabolites, qui requiert une grande reproductibilité dans la préparation, et peut induire un biais expérimental. Il s'agit de la méthode HRMAS pour high resolution magic angle spinning, qui est issue de la RMN du solide. La RMN HRMAS permet d'obtenir des spectres hautement résolus sans aucune préparation des échantillons. Pour cela l'échantillon, placé dans un insert, est incliné à un angle de  $54,7^\circ$  (appelé angle magique) et tourne à grande vitesse (4000Hz dans nos expériences) (Tilgner et al., 2019). Notamment, cette méthode s'est révélée extrêmement robuste et reproductible pour l'analyse de tissu cérébral (Fauvelle et al., 2012).

En contrepartie, la principale limite de la RMN est son manque de sensibilité par rapport à la SM (A.-H. M. Emwas, 2015a). De ce fait, la plupart des études en RMN sont focalisées sur la découverte de biomarqueurs plutôt que sur l'identification complète du métabolome. Néanmoins, les améliorations technologiques ont permis d'augmenter cette sensibilité, notamment par l'utilisation d'aimants à très hauts champs et par l'utilisation de cryo-sondes. De plus, l'utilisation de très haut champs permet d'augmenter la fenêtre spectrale en RMN du proton, limitant ainsi la superposition des différents pics.

### *c. Utilisation combinée : SM et RMN*

Afin d'obtenir une couverture plus importante du métabolome, certaines études se proposent d'utiliser ces deux méthodes de façon conjointe. En effet, la RMN et la SM peuvent être combinées au niveau analytique, par l'association physique des deux méthodes, ou simplement au niveau du traitement des données, par l'intégration des données respectives (pour review voir Letertre, Dervilly, et al., 2021).

La combinaison analytique de la RMN et de la SM, qui est souvent couplée à la chromatographie en phase liquide, a notamment permis de contribuer à élucider la structure de produits naturels. Néanmoins, les nombreuses étapes de manipulation et de préparation des échantillons associées à l'utilisation de ce système hybride ont limité son utilisation. De plus, l'incompatibilité des solvants, le faible débit pour une ionisation et une détection SM efficaces, et le temps long d'acquisition nécessaire pour une sensibilité RMN suffisante (Silva Elipe, 2003) n'ont pas été surmontés. Il semble donc peu probable qu'un tel système continue

d'être développé, d'autant plus que des solutions de combinaison plus prometteuses, basées sur l'intégration des données, sont en cours de développement.

Cette intégration peut être réalisée à différents niveaux, par comparaison croisée, corrélation ou par intégration multibloc.

Notamment des approches de corrélation ont été développées afin d'obtenir une image plus large des processus biologiques et mieux comprendre les interactions métaboliques. De plus, elles ne se limitent pas aux interactions métaboliques puisque des réseaux de corrélation ont par exemple été utilisés pour explorer les associations gènes-métabolites (Mounet et al., 2009; Teul et al., 2009).

L'intégration multibloc, ou fusion de données, est de plus en plus utilisée dans les sciences omics depuis une vingtaine d'année (Boccard & Rudaz, 2014). Elle consiste à combiner des blocs individuels de données prétraitées, sans effectuer de sélection préalable de variables, avant de modéliser et d'interpréter le résultat global (Boccard & Rudaz, 2014; Letertre, Dervilly, et al., 2021).

La RMN (950MHz - 22,7T) a été utilisée pour l'ensemble des travaux de cette thèse car elle est la technique de choix pour les approches métabolomiques en clinique, notamment pour la découverte de biomarqueurs: polyvalente, largement automatisable, quantitative, reproductible, facile à utiliser et ne nécessitant pratiquement aucune préparation d'échantillon, elle peut être mise en œuvre à haut débit et à faible coût, ce qui lui confère un grand potentiel pour les applications dans le domaine de la santé. Les points clés des analyses métabolomiques utilisant cette méthode sont présentés plus en détails ci-après.

### 3. Analyse métabolomique par RMN

Une étude métabolomique se décompose en plusieurs étapes, qui nécessitent d'être les plus standardisées possible, afin de limiter les biais expérimentaux et d'assurer une grande reproductibilité. Il s'agit i) de poser la question biologique, ii) réaliser le flux analytique, incluant la phase pré-analytique et la phase analytique, puis iii) la phase de traitement des données, qui inclue le plus souvent une phase de pré-traitement, puis de traitement statistique multivarié, conduisant à l'identification de biomarqueur, et finalement iv) la remise en contexte biologique et validation des hypothèses.

La figure 13 présente le schéma général d'une analyse métabolomique par RMN telle que réalisée lors de mes travaux.

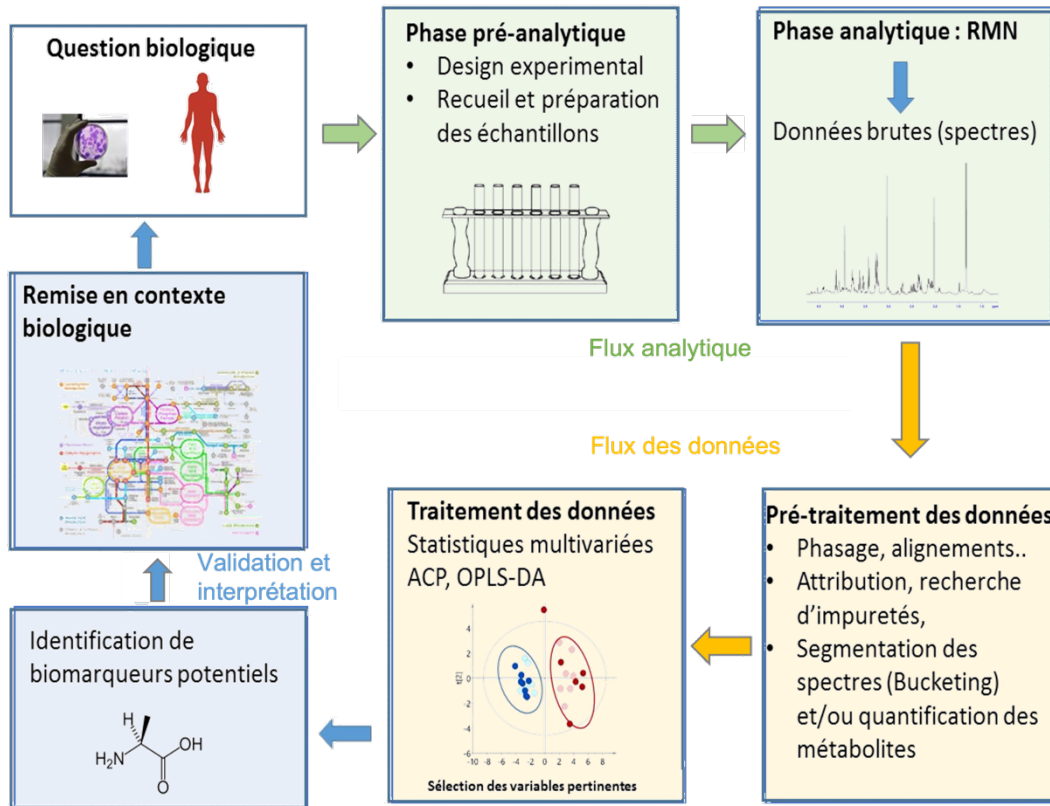


Figure 13 : Workflow d'une analyse métabolomique par RMN

### a. Le flux analytique

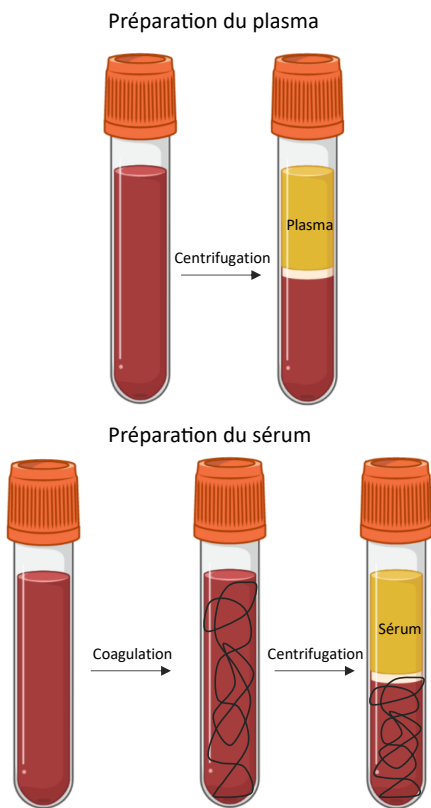
#### i. Phase pré-analytique : préparation des échantillons

Plusieurs types d'échantillons peuvent contenir de l'information métabolomique pertinente, allant de la cellule à des organismes entiers. Néanmoins, les deux types les plus souvent utilisés, notamment dans la recherche de biomarqueurs pour la clinique, sont les biofluides tels que l'urine, le sang, le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les tissus.

En ce qui concerne la recherche de biomarqueurs de maladies neurologiques, le tissu cérébral provenant de modèles animaux ou de biopsies issues de la chirurgie, ainsi que le LCR sont privilégiés car en lien direct avec le système nerveux. Cependant, leur prélèvement nécessitant des procédures invasives, la collecte de ce type d'échantillons est limitée. Néanmoins, il est intéressant de noter que les métabolites peuvent traverser la barrière

hémato-encéphalique, de sorte que les molécules présentes dans la circulation sanguine sont potentiellement des témoins des phénomènes biologiques qui se produisent dans le système nerveux central (Donatti et al., 2020). Ainsi, le sang, qui peut être facilement collecté en grande quantité et de façon répétée, permet des études longitudinales et la transversalité entre les modèles animaux et l'homme, et donc facilite l'application clinique. Il représente ainsi un échantillon de choix pour le développement de biomarqueur (Song et al., 2019).

Le plasma et le sérum sont tous deux obtenus par centrifugation du sang total (Figure 14). L'obtention du plasma présente l'avantage d'être rapide mais nécessite l'ajout d'un anticoagulant, comme l'EDTA ou l'héparine, pouvant interagir avec les métabolites et introduire des pics intenses dans les spectres (Teahan et al., 2006; Yu et al., 2011). A l'inverse, l'obtention du sérum nécessite plus de temps, dû à une étape supplémentaire de coagulation,



et est plus délicate, notamment pour limiter la dégradation des métabolites durant le temps de coagulation. Cependant, le contrôle de la température des échantillons durant cette étape, ainsi que le contrôle du temps entre le prélèvement de sang et la congélation du sérum, permet la conservation des métabolites dans des concentrations pouvant même être supérieures à celles obtenues dans le plasma (Yin et al., 2013; Yu et al., 2011). Malgré ces quelques différences, plusieurs études comparatives ont mis en évidence une grande similitude dans les résultats obtenus sur la base de l'analyse du plasma et du sérum (Kaluarachchi et al., 2018; Liu et al., 2018).

**Figure 14 : Préparation du plasma et du sérum sanguin**

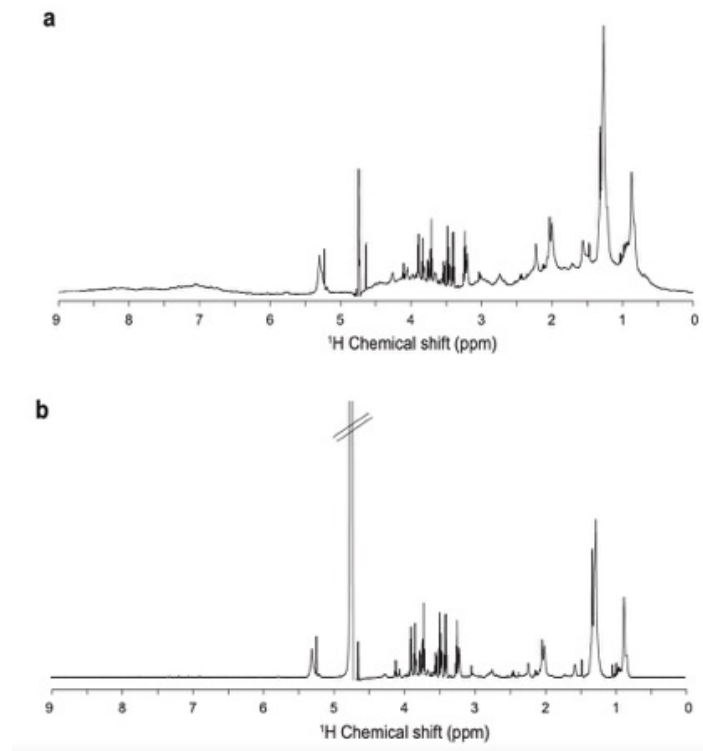
Les métabolites présents dans ces fractions peuvent être analysés directement, limitant ainsi d'éventuels biais expérimentaux (Beckonert et al., 2007; Yanibada et al., 2018), ou au contraire ils peuvent être extraits afin d'éliminer les protéines sanguines et les lipides qui peuvent gêner voire empêcher la détection de certains métabolites d'intérêts, soit en masquant leurs pics soit en les complexant (A.-H. Emwas et al., 2019).

Cependant, dans le cadre de ma thèse, j'ai décidé de limiter la transformation de l'échantillon afin de simplifier au maximum la phase pré-analytique pour faciliter la transposabilité et la standardisation de notre approche entre différents centres ou cohortes (Hernandes et al., 2017). J'ai aussi évité l'ajout d'anticoagulant, qui n'est pas toujours homogène en fonction des fournisseurs et qui pourrait aussi limiter la détection de certains métabolites peu concentrés (Sotelo-Orozco et al., 2021).

D'autres part, dans ce travail de thèse, nous avons aussi utilisé la RMN HRMAS de tissus cérébraux bruts afin de corroborer les résultats du sérum avec ceux de structures cérébrales impactées dans la MP, dans un but plus mécanistique.

## *ii. Phase analytique*

En l'absence de méthodes d'extraction chimiques, le spectre RMN proton de sérum présente une ligne de base distordue, qui correspond au signal des lipides et des macromolécules, empêchant la quantification du signal des métabolites (Figure 15A). Il est possible d'éliminer plus ou moins ce signal de macromolécule au moment de l'acquisition en utilisant la séquence d'impulsions Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), en fonction du temps d'écho TE, pendant lequel le signal des lipides et macromolécules va décroître selon leur temps de relaxation  $T_2$ . Ainsi, plus le TE est long et plus ces signaux larges vont être atténués, cependant les signaux des petites molécules vont aussi décroître, même si beaucoup moins rapidement. Il faut donc trouver le meilleur compromis possible pour le TE. Dans notre étude, nous avons optimisé le TE à 120 ms (Figure 15B). Le principal désavantage de l'utilisation de cette séquence est que la quantification absolue n'est plus possible.



**Figure 15 : Spectres RMN du proton d'échantillon de sérum**

(A) Spectre RMN proton de sérum sans CPMG ; (B) Spectre RMN proton avec la séquence CPMG (TE=120ms). (Adapté de la thèse d'Elodie Jobard, 2014)

*b. Le flux de traitement des données RMN*

*i. Pré-traitement des spectres RMN*

Le pré-traitement correspond à la génération de la matrice des données à partir des spectres. Les données brutes obtenues par RMN sont des signaux temporels, qui doivent être transformés en spectres par transformée de Fourier. Les spectres RMN de biofluides sont constitués de centaines de pics, correspondant à la somme des spectres individuels de chaque métabolite présent dans le milieu.

Pratiquement, l'étape de pré-traitement correspond à la correction de la ligne de base et à l'alignement des spectres afin de pouvoir les comparer, puis à la génération des variables RMN afin de constituer le tableau de données. Cela demande de la connaissance a priori, pour aligner correctement les spectres sur un pic de référence, et corriger la ligne de base sans distordre le signal, et pour exclure des signaux n'étant pas des métabolites (impureté ou autre).



Comme pour l'étape d'échantillonnage et d'acquisition, l'étape de pré-traitement doit être rigoureusement identique pour tous les spectres d'une expérience.

Les variables RMN sont, soit des concentrations de métabolites, soit des segments de spectres de taille plus ou moins grande ou de taille variable appelés « buckets ». Ainsi, les signaux bruts vont être convertis en signaux numériques correspondant à l'aire sous chaque bucket.

Les buckets ainsi obtenus sont le plus souvent normalisés. La normalisation est une correction mathématique appliquée aux données expérimentales afin d'ajuster les variations systématiques, techniques et incontrôlables (biais). Plusieurs méthodes de normalisation ont été décrites et sont encore en cours de développement (Kohl et al., 2012). Les 2 plus connues sont la normalisation PQN (Probabilistic quotient normalisation) et la normalisation sur la somme (Kohl et al., 2012). Cette dernière est la plus couramment utilisée en métabolomique et correspond à la division de chaque bucket par l'intensité totale du spectre RMN. Elle permet de réduire ou de minimiser les effets de la dilution entre les échantillons. Particulièrement adaptée pour des analyses non ciblées, et compte tenu des différences d'intensité globale de signal rencontrées entre nos échantillons de sérum, cette méthode a été utilisée pour l'ensemble des analyses des biofluides au cours de ce travail de thèse. Cependant, si cette approche ne permet qu'une quantification relative de la quantité des métabolites, elle n'est pas exclusive, ce qui signifie que la quantification des métabolites peut aussi être réalisée, soit en parallèle soit après l'analyse statistique.

Pour cela, l'identification de l'ensemble des pics, appelée « attribution », est nécessaire afin d'exclure des analyses statistiques des composés n'étant pas des métabolites, essentiellement des contaminants comme par exemple l'alcool.

Un métabolite est considéré comme identifié lorsque tous ses déplacements chimiques (pics) correspondent à ceux de la molécule candidate. L'attribution se fait grâce aux bases de données publiques telle que HMDB (Wishart et al., 2018), à la littérature, à partir d'expériences RMN à 2 dimensions, et/ou par l'ajout de métabolites standards dans l'échantillon.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons utilisé un spectromètre RMN à très haut champ (22.3 T – fréquence du proton 950 Mhz), or l'attribution des spectres de sérum

est généralement réalisée à 600 MHz. Ainsi, nous avons eu recours à l'ensemble de ces méthodes, dont l'ajout dosé de métabolites standards, pour valider l'attribution de l'ensemble du spectre.

ii. *Traitement des données : Statistiques multivariées*

Transformation des données : En premier lieu, si les variables ne suivent pas une loi normale, il est possible de les transformer, en leur appliquant une fonction mathématique de type puissance, racine carrée, ou logarithme. Ainsi, dans notre étude, seules les données provenant des patients ont subi une transformation logarithmique afin de suivre une loi normale.

Mise à l'échelle (scaling) : Dans un second temps, en fonction du type d'échantillon, les données RMN peuvent être mises à l'échelle (« scaling » en anglais) afin d'ajuster les variances et donc éviter qu'une variable intense n'influe trop sur le modèle multivarié, alors que potentiellement, tout métabolite peut être discriminant, quel que soit son niveau d'expression. Parmi les méthodes de scaling les plus utilisées, on peut notamment citer : l'unit-variance (UV) scaling et le Pareto-scaling. L'UV scaling consiste à centrer les variables RMN et à les diviser par l'écart type. Ainsi, l'UV scaling permet de donner un poids égal à toutes les variables, avec comme inconvénient de donner de l'importance au bruit présent dans le spectre. Lors du Pareto-scaling, les variables sont centrées et divisées par la racine carrée de l'écart type. Le Pareto scaling donne à la variable une variance égale à son écart-type au lieu d'une variance unitaire dans l'UV scaling, ce qui limite l'impact du bruit.

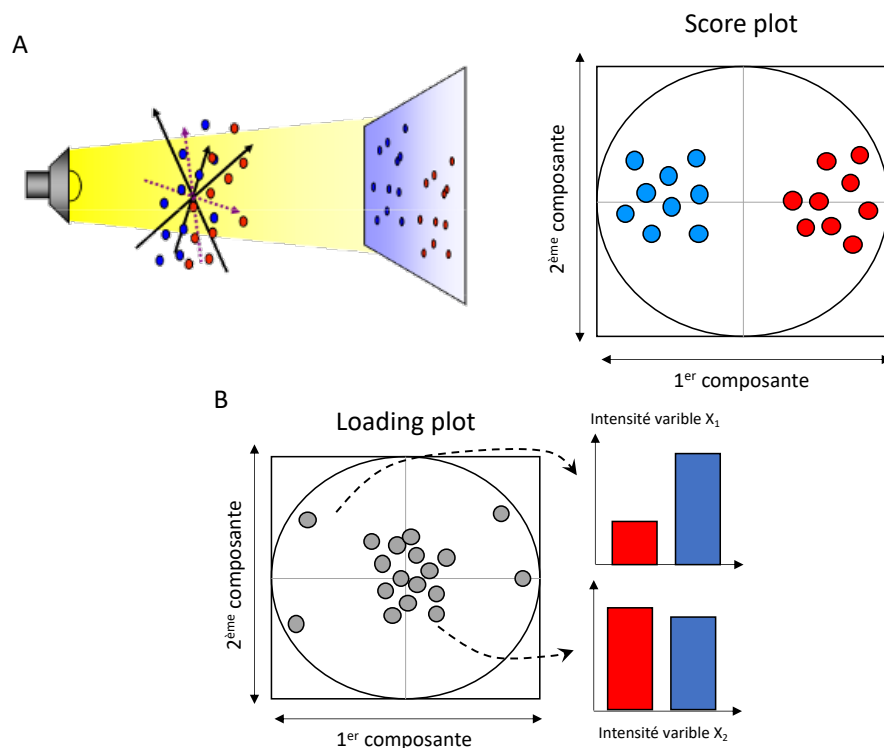
Statistiques multivariées : L'objectif des statistiques multivariées est de construire un profil métabolique global à partir des données. Pour cela, les méthodes de projection graphiques sont les plus utilisées en métabolomique.

Cela signifie que ces méthodes vont permettre de visualiser l'ensemble des données simultanément sur des graphiques, représentant d'un côté les individus et de l'autre les variables, rendant ainsi leur interprétation plus simple et directe, ce qui permet donc de trier l'information et de se focaliser sur la plus pertinente pour la question étudiée.

Ces méthodes sont basées sur la compression de l'information multivariée, afin de produire des variables latentes appelées composantes principales, de nombre réduit par rapport au nombre de métabolites initiaux. Ces composantes principales sont classées en

fonction de leur capacité à expliquer la variance de la matrice de données (la première composante explique la plus grande variance, la seconde, orthogonale à la première, explique une partie de la variance résiduelle non expliquée par la première, etc....). Cela permet de projeter ensuite les données dans un repère de dimensions réduites comme un plan ou un volume à 3 dimensions.

Dans le graphe des individus, appelé « score plot », les observations pourront être regroupées en fonction de leurs similitudes ou à l'inverse séparées en fonction de leurs différences (Figure 16A). Simultanément, les variables expliquant cette séparation sont également représentées dans un graphe appelé graphe des loadings (« loading plot »), permettant leur visualisation aux niveaux des extrémités du graphique par analogie avec les échantillons, qui soit les sur-expriment soit les sous-expriment (Figure 16B).



**Figure 16 : Analyses multivariées de type ACP et PLS en métabolomique. (Adapté depuis User guide to SIMCA, 2015)**

En métabolomique, on utilise essentiellement deux types d'analyses multivariées : les analyses non supervisées et supervisées.

L'analyse en composante principale (ACP), est le plus souvent utilisée en première intention comme méthode non supervisée, et a pour but de visualiser la distribution des différents échantillons sans aucun à priori permettant ainsi d'identifier d'éventuels échantillons anormaux ou des clusters d'individus.

Les analyses supervisées, telles que la régression des moindres carrés partiels ou PLS (Partial Least Squares), ont pour but d'expliquer une variable annexe continue (score d'une échelle) ou discrète (appartenance à un groupe, PLS-DA pour analyse discriminante), représentant ce que l'on appelle dans certains logiciels la matrice des Y, par rapport aux métabolites (la matrice des X). L'objectif est de construire un modèle statistique qui maximise la variance intergroupe tout en minimisant la variance intragroupe, afin de maximiser la séparation entre les classes d'appartenance des observations. Il permet ainsi de mettre en évidence les métabolites qui permettent de séparer les groupes, et de prédire la classification d'un nouvel échantillon sans connaissance à priori. De plus, il est possible de représenter les loadings dans un graphe à une dimension, permettant de visualiser à la fois la covariance et la corrélation des métabolites avec le groupe d'appartenance. Ce graphe se présente sous la forme d'un « spectre statistique appelé S-line dans le logiciel SIMCA, qui comporte des pics positifs ou négatifs selon le sens de variation des métabolites dans un groupe par rapport à l'autre, et une échelle de couleur indiquant leur niveau de corrélation.

L'OPLS (orthogonal PLS) est le plus souvent utilisée actuellement, car elle intègre un filtre orthogonal (Trygg & Wold, 2002), qui permet de séparer la variance corrélée aux Y (donc aux groupes d'étude) à la variance non corrélée, qui est supposée due à de la variabilité expérimentale dans l'échantillonnage ou dans l'analyse par exemple. Cette variabilité expérimentale, ou liée à un facteur non contrôlé dans l'expérience, masque la variance explicative que l'on cherche à modéliser.

Une fois qu'un modèle de discrimination est obtenu, de nombreux outils sont disponibles pour s'assurer de sa robustesse et ainsi valider ses performances.

Tout d'abord, les paramètres R<sup>2</sup> et Q<sup>2</sup>, qui représentent respectivement la variance expliquée et prédite, permettent d'évaluer la qualité du modèle. La valeur de Q<sup>2</sup> est estimée par une procédure de validation croisée, qui consiste à utiliser une partie des échantillons pour construire le modèle et une autre partie pour prédire la classification, et ce de manière itérative, jusqu'à ce que toutes les observations aient été prédites au moins une fois. C'est ce que l'on appelle aussi de la « validation interne ». La validation croisée permet de définir le

nombre optimum de composantes significatives dans le modèle (Wold, 1978), et d'évaluer la prédictivité du modèle. Plus le  $Q^2$  est élevé, plus le modèle peut être considéré comme prédictif. Un modèle est considéré comme acceptable avec  $Q^2 > 0,5$ , robuste avec  $Q^2$  compris entre 0,5 et 0,8, et extrêmement robuste au-delà (Triba et al., 2015). Cependant, au-delà de ces considérations générales, il faut nuancer ces seuils en fonction des études. Dans le cas des études sur échantillons humains, l'importante variabilité interindividuelle peut masquer en partie les variations métaboliques liées à la pathologie, et les changements globaux sont en général relativement faibles entre les différents groupes. De plus, l'application du filtre orthogonal (O) permet de baisser les seuils de  $Q^2$  en-dessous de 0.5. Ce seuil dépend aussi du « scaling » ayant été appliqué. Un pareto scaling autorise des seuils plus bas car il limite l'importance du bruit.

Dans notre étude, nous considérons qu'un modèle prédictif est statistiquement robuste si sa valeur  $Q^2$  est  $\geq 0,4/0,5$  (Blasco et al., 2018; Worley & Powers, 2012).

L'un des outils les plus utilisés pour valider les performances d'un modèle est le test de permutation ou ré-échantillonnage sous l'hypothèse nulle, à travers des permutations aléatoires des variables Y. La diminution des paramètres de qualité d'ajustement  $R^2$  et  $Q^2$ , lorsque la corrélation entre le modèle original et les modèles aléatoires diminue, indique la bonne qualité du modèle (Worley and Powers, 2012).

La CV-ANOVA est utilisée pour évaluer la significativité du modèle. Le diagnostic est basé sur une évaluation ANOVA des résidus prédictifs à validation croisée (CV) d'un modèle (Eriksson et al., 2008). Il s'agit d'un outil rapide et simple pour évaluer la performance d'un modèle, contrairement au ré-échantillonnage sous l'hypothèse nulle, qui peut être plus coûteux en temps de calcul lorsque l'on dispose d'un grand ensemble de données avec de nombreuses composantes.

Cependant, dans la mesure du possible, la meilleure méthode pour s'assurer de la validité et de la robustesse d'un modèle, est la prédiction en aveugle d'une cohorte indépendante avec le modèle, ce que l'on appelle la validation externe.

Statistiques univariées : A la suite de ces analyses, les métabolites d'intérêt, définis comme ayant une corrélation supérieure à 0,5 identifiés sur la S-line, ont été soumis à des analyses statistiques univariées classiques. Elles permettent, contrairement aux analyses multivariées, d'analyser une à une les variables explicatives sans tenir compte des interactions existantes entre chacune d'entre elles. Ainsi, ces approches permettent d'évaluer les

altérations des métabolites dans un groupe d'échantillons par rapport à un autre, et donc de mettre en évidence un ou des biomarqueurs et non un profil complet.

A la fin de ces étapes, intervient l'interprétation biologique de ces dérégulations, afin de comprendre les origines ou causes des dérégulation observées.

En effet, même dans les études de métabolomique à visée diagnostic ou pronostic, il est important d'évaluer la pertinence des dérégulations observées en fonction de la question posée.

De façon intéressante, ces dérégulations peuvent être présentes dès les phases précoces d'une pathologie lorsque celle-ci est encore silencieuse d'un point de vue symptomatique. De plus, la métabolomique, par l'étude du produit final de l'expression des gènes, permet de se rapprocher du phénotype en mesurant l'impact de facteurs extérieurs tel que le stress ou l'environnement, là où les changements d'expression d'un gène ou d'une protéine ne se matérialisent pas nécessairement directement du point de vue phénotypique.

La métabolomique représente donc une approche de choix pour l'étude de la MP et notamment pour l'amélioration de son diagnostic ainsi que pour fournir des pistes pour la recherche de nouvelles thérapies.

## C. Études métabolomiques dans la maladie de Parkinson

### 1. Perturbations métaboliques et physiopathologie de la MP

La MP est associée à une atteinte multisystémique, de multiples voies de signalisation cellulaire et différents mécanismes moléculaires sont donc impliqués dans sa pathogenèse. De nombreuses études de métabolomique, effectuées sur différents types d'échantillons (sang, LCR, tissus...), ont permis de mettre en évidence les principales voies métaboliques perturbées dans la MP. La majorité des études démontrent que les voies liées au métabolisme énergétique sont les plus touchées (Anandhan, Jacome, et al., 2017; Anandhan, Lei, et al., 2017a; Powers et al., 2017; Shao & Le, 2019).

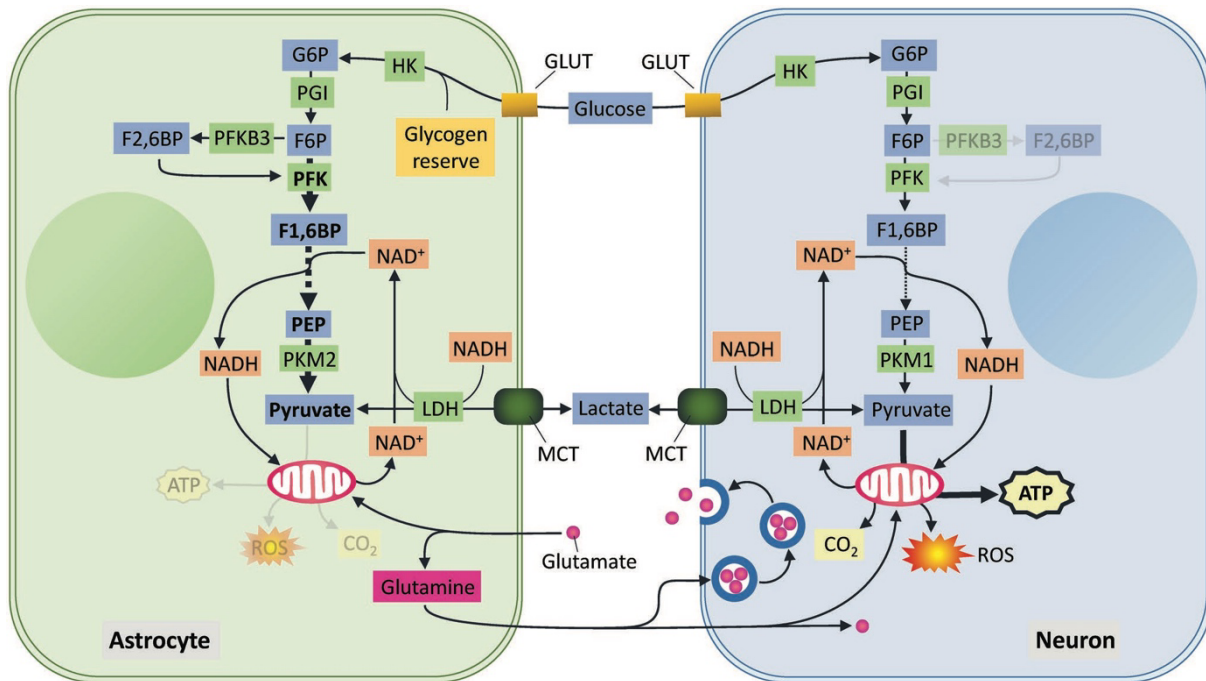
### *a. Métabolisme énergétique*

#### *i. Métabolisme énergétique en condition physiologique*

Le cerveau est un organe métaboliquement très actif dont les besoins énergétiques fluctuent rapidement en fonction de son état d'activité, élevé ou bas. Cependant, ses réserves d'énergie endogènes sont faibles (Peters, 2011). Ainsi, son fonctionnement normal nécessite un approvisionnement continu en substrats exogènes, notamment en glucose, le substrat énergétique exogène prédominant dans le cerveau et principalement obtenu via la circulation sanguine (Dienel, 2019).

La voie la plus importante du métabolisme du glucose est la glycolyse, qui génère deux molécules de pyruvate par molécule de glucose. Cependant, dans certaines conditions, comme par exemple en condition anaérobie ou lors d'une demande importante en énergie, le pyruvate peut être converti en lactate, qui sera libéré dans le milieu extracellulaire pour maintenir la concentration de nicotinamide adénine dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ) nécessaire à la glycolyse. De plus, bien que les neurones et les astrocytes génèrent tous deux du lactate à partir du glucose (Rabinowitz & Enerbäck, 2020; Rogatzki et al., 2015), l'hypothèse de l'existence d'une navette lactate astrocytes-neurones suggère que les neurones utiliseraient préférentiellement le lactate libéré par les astrocytes pour la formation du pyruvate (Pellerin and Magistretti, 1994).

En présence d'oxygène, le pyruvate est ensuite dirigé vers les mitochondries pour réaliser la phosphorylation oxydative afin de générer 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) (Figure 17).

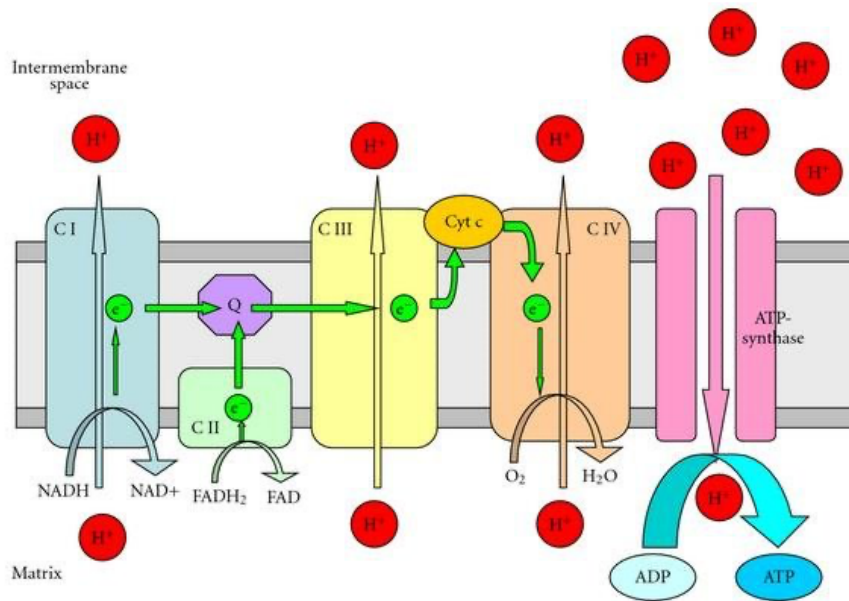


**Figure 17 : Répartition des voies énergétiques entre les neurones et les astrocytes.**

Les neurones et les astrocytes peuvent absorber du glucose et le métaboliser via la glycolyse et la phosphorylation oxydative. De plus, les astrocytes peuvent soutenir la phosphorylation oxydative neuronale en transférant du lactate via la navette lactate. *(Adapté de Murali Mahadevan et al. 2021)*

A cette fin, après avoir été importé dans les mitochondries par le transporteur du pyruvate mitochondrial (MPC), le pyruvate est irréversiblement transformé en acétyl-Coa via l'action du complexe enzymatique de la pyruvate déshydrogenase (PDH). L'acétyl-Coa ainsi formé va être dégradé par une série de réactions cycliques appelées cycle de Krebs, ou cycle de l'acide citrique (TCA en anglais). Ces réactions ont pour but de former des navettes énergétiques intermédiaires sous forme de coenzymes, qui vont être utilisés par la suite par la chaîne de respiration de la mitochondrie. Cette chaîne fait appel à 5 complexes protéiques différents, tous localisés dans la membrane interne de la mitochondrie, au travers desquels s'effectue un transfert d'électrons associé à un échange de protons  $H^+$  entre la matrice et l'espace intermembranaire. Cet échange permet la production d'ATP par l'ATP-synthase (Figure 18).





**Figure 18 : Biosynthèse de l'ATP à travers la chaîne respiratoire mitochondriale.**

La synthèse d'ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale fait intervenir un transport d'électrons au travers des différents complexes de la membrane interne de la mitochondrie. Le transport d'électrons à travers le complexe 1 (C I) et le complexe 2 (C II) est généré par la conversion du NADH en NAD<sup>+</sup> par la NADH ubiquinone réductase (complexe 1) et par la conversion du FADH<sub>2</sub> et FAD via la succinate ubiquinone réductase (complexe 2) et l'intervention du coenzyme Q. Ces électrons sont ensuite transférés vers le cytochrome c par l'enzyme ubiquinol cytochrome c reductase du complexe 3 (C III) pour enfin atteindre le complexe 4 (C IV) où l'enzyme cytochrome c oxydase les utilise pour convertir le dioxygène (O<sub>2</sub>) en eau (H<sub>2</sub>O). Au cours de ce transfert d'électrons, des ions H<sup>+</sup> sont libérés à travers les complexes 1, 2 et 4 pour permettre la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (complexe 5). (d'après Keane et al, 2011)

De plus, il est important de noter que l'accès au glucose provient majoritairement de l'alimentation et qu'il est donc fluctuant. C'est pourquoi d'autres sources d'ATP peuvent être utilisées telles que le glutamate, qui peut entrer directement dans le cycle TCA comme source de carbone alternative pour les neurones (Bélanger et al., 2011; Magistretti, 2009), ou encore les corps cétoniques, utilisés pour fournir de l'acétyl-Coa. Ces derniers, qui proviennent de la beta oxydation des acides gras dans le foie et qui sont transportés jusqu'aux neurones par la circulation sanguine, pourraient fournir jusqu'à 2/3 des besoins en énergie du cerveau (Iglesias et al., 2017; Schönfeld & Reiser, 2013).

ii. *Dérégulation du métabolisme énergétique dans la MP*

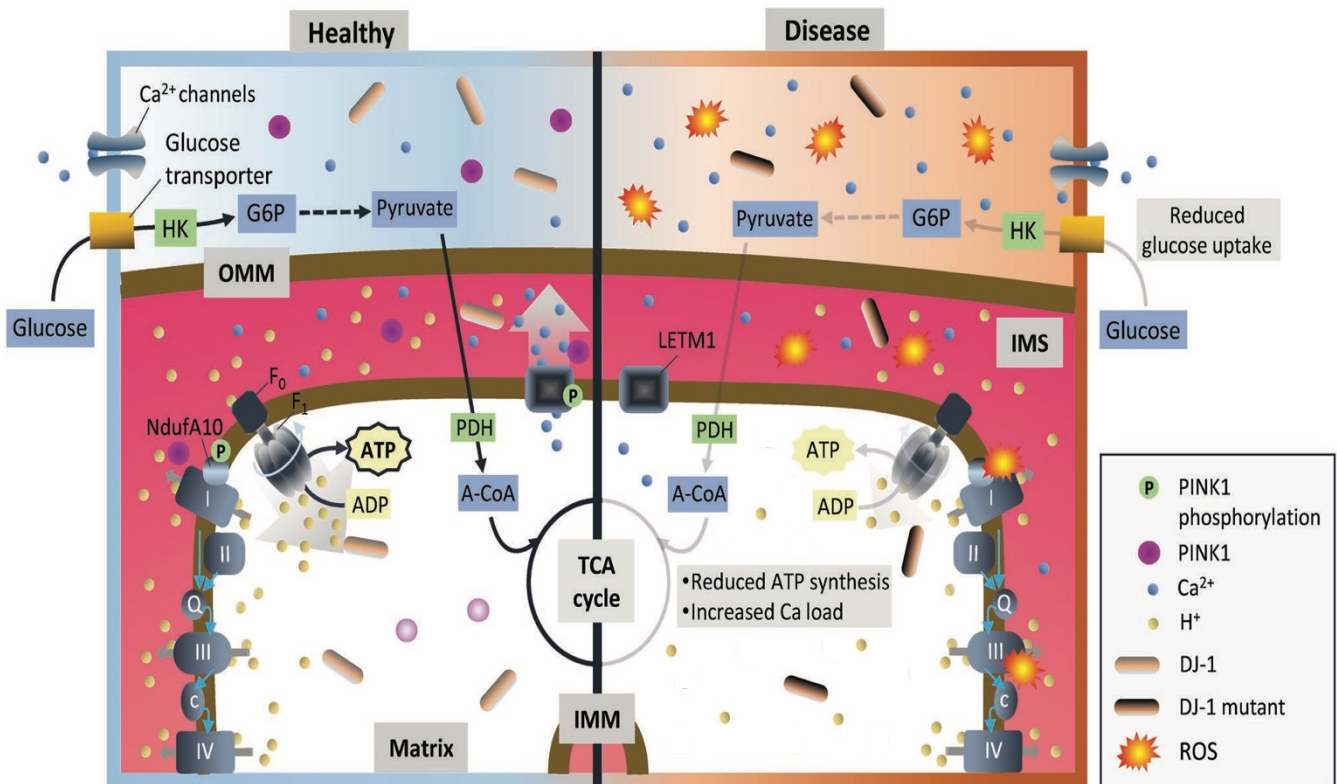
L'utilisation des approches métabolomiques dans le cadre de la MP a permis de mettre en évidence des défaillances au niveau de différentes étapes du métabolisme énergétique décrit ci-dessus (Figure 19). En effet, il a été montré que la perturbation de la glycolyse, notamment au niveau astrocytaire, peut conduire à des lésions axonales et à une neurodégénérescence (Y. Lee et al., 2012; Volkenhoff et al., 2015). De plus, une diminution de la glycolyse favoriserait l'agrégation d'alpha-synucléine (Bellucci et al., 2008). Cette diminution a également été rapportée dans des modèles cellulaires de certaines formes génétiques de la MP, notamment celles impliquant les gènes PINK1 et DJ-1 qui régulent indirectement la glycolyse, le flux de protons et donc le stress oxydant (Dawson et al., 2010; Murali Mahadevan et al., 2021).

De manière intéressante, des études menées dans différents modèles animaux MPTP ont montré qu'une augmentation de la glycolyse, afin de générer de plus grandes quantités d'ATP, avait un effet neuroprotecteur (Anandhan, Lei, et al., 2017b; Badisa et al., 2010; A. D. Chaudhuri et al., 2015). De même, des effets neuroprotecteurs ont été observés dans différents modèles de la MP suite à une supplémentation en glucose ou une stimulation pharmacologique de la phosphoglycerate kinase, une enzyme intermédiaire de la glycolyse (Cai et al., 2019; Duan & Mattson, 1999).

Des études métabolomiques réalisées sur du sang de patients parkinsoniens ont révélé des taux anormalement élevés de lactate et de pyruvate, indicateurs d'une hyperactivité de la glycolyse, qui pourrait ainsi agir comme un mécanisme compensatoire.

Néanmoins, cette augmentation de la glycolyse peut également conduire à la formation anormale d'espèce réactive de l'oxygène (ROS). En effet, au cours du processus de phosphorylation oxydative, des électrons peuvent s'échapper de la mitochondrie via les complexes 1 et/ou 3, et interagir avec l'oxygène et l'azote circulant, conduisant à la formation de ROS, qui, en forte quantité, sont toxiques pour la cellule (Anandhan, Jacome, et al., 2017).

Dans des conditions physiologiques normales, la cellule met en place des mécanismes antioxydants capables de les prendre en charge pour les éliminer. Cependant, un déséquilibre entre les mécanismes de production et ceux d'élimination, pourrait être à l'origine d'un stress oxydant toxique pour la cellule, ce qui questionne quant au rôle réel des dérégulations de la glycolyse dans la physiopathologie de la MP.



**Figure 19 : Perturbations métaboliques dans la MP.** L'absence de la protéine DJ-1 et/ou la présence de mutants de DJ-1 affectent le statut respiratoire neuronal et la dynamique mitochondriale en augmentant la fuite de protons à travers l'IMM, la production de ROS et en réduisant l'activité de l'ATP synthase (panneau de droite). IMM : Membrane mitochondriale interne ; IMS : Espace inter-membranaire ; OMM : Membrane mitochondriale externe (Adapté de Murali Mahadevan et al. 2021)

Au-delà de la glycolyse, des voies alternatives de production d'ATP sont également affectées dans la MP. En effet, le cerveau a notamment la capacité d'utiliser les acides gras, par le biais de la bêta-oxydation, pour produire de l'acétyl-Coa. Ainsi, une diminution de cette capacité d'utilisation a été observée chez des patients parkinsoniens et dans des modèles MPTP (voir pour review Abou-Hamdan et al., 2011). A l'instar de la glycolyse, ces voies alternatives ont également été envisagées comme cible thérapeutique afin d'augmenter la production d'ATP. En ce sens, des études ont rapporté qu'une augmentation de la bêta-

oxydation des acides gras pourrait être à l'origine d'une amélioration motrice chez le patient et dans des modèles génétiques et neurotoxiques de la MP (Abou-Hamdan et al., 2011; Ueno et al., 2018; Vos et al., 2021; Worth et al., 2014).

De façon similaire, il a été montré qu'une alimentation riche en corps cétoniques, un autre substrat alternatif utilisable par la mitochondrie pour générer de l'acétyl-Coa, atténue les symptômes de la MP chez des souris et pourrait protéger contre la mort des neurones dopaminergiques dans la SNc et (Norwitz et al., 2019; Tieu et al., 2003; Yang and Cheng, 2010). Notamment, l'utilisation du bêta-hydroxybutyrate, un des deux principaux corps cétoniques utilisables par le cerveau (avec l'acétoacetate), permettrait de maintenir une respiration mitochondriale normale (Tieu et al., 2003)

Ajouté à cela, la découverte de l'induction d'un phénotype parkinsonien chez des animaux, par l'injection d'inhibiteurs du complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale (6-OHDA, MPTP...), a permis de confirmer l'existence d'un lien fort entre la MP et les dysfonctionnements de la mitochondrie. D'ailleurs, des analyses post mortem par westernblot et d'immunoblot à partir de cerveaux de patients atteints de la MP, ont montré une diminution du complexe I dans le striatum (Mizuno et al., 1989) et la SNc (Schapira et al., 1990).

Ainsi, il apparaît clairement qu'une dérégulation des principales voies impliquées dans le métabolisme énergétique cellulaire pourrait expliquer une partie de l'étiologie de la MP. De plus, compte tenu du rôle central de la mitochondrie dans la phosphorylation oxydative, indispensable à la production d'ATP, ses dysfonctions pourraient être un acteur majeur de cette étiologie.

#### *b. La mitochondrie entre métabolisme énergétique et mort cellulaire*

La mitochondrie est un des sites principaux de production des ROS dans les cellules. Lors du processus de phosphorylation oxydative, une proportion significative de l'oxygène subit une réduction partielle au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale et échappe à la réduction complète en eau (Murphy, 2009). La production de ces ROS dépend ainsi du statut respiratoire de la mitochondrie. Les ROS peuvent jouer un rôle dans la signalisation cellulaire, mais sont surtout connus pour leur toxicité via l'oxydation de

biomolécules (ADN, protéines, lipides, sucres), altérant ainsi leur structure et leurs propriétés biologiques (Exner et al., 2012). La mitochondrie est donc une source, mais également une cible directe, des ROS qui vont favoriser l'accumulation de mutations de son ADN (ADNmt) et participer à l'altération de la fonction, de la morphologie et du renouvellement de ces organites (Guillet-Pichon & Verny, 2016). En effet, une fréquence plus haute de délétions somatiques de l'ADNmt a été révélée chez les patients atteints de la MP par rapport aux sujets contrôles (Bender et al., 2006).

Compte tenu de son métabolisme oxydatif très élevé, le cerveau est particulièrement sensible aux dommages causés par le stress oxydant. Plus précisément, plusieurs études ont montré que les neurones dopaminergiques de la SNc sont très vulnérables à ce stress puisqu'ils contiennent une forte concentration de mitochondries et que l'oxydation de la dopamine elle-même peut entraîner l'accumulation de ROS (Pacelli et al., 2015).

Par ailleurs, les capacités anti-oxydantes de la SNc sont plus réduites que dans d'autres régions du cerveau (Dias et al., 2013; Herrera et al., 2017), ce qui pourrait expliquer pourquoi cette zone est tout particulièrement touchée dans la MP (McGeer and McGeer, 2008; Mena et al., 2002; Niranjana, 2014). En effet, l'environnement astrocytaire y est faible, or ces cellules sont impliquées dans l'approvisionnement des neurones en acteurs antioxydants et neuroprotecteurs.

Ainsi, les mitochondries font l'objet de nombreuses études pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques visant à réduire l'accumulation de ROS. De plus, il a été suggéré que l'utilisation d'autres sources d'énergie, comme la bêta oxydation des acides gras ou les corps cétoniques, entraînerait une accumulation moins importante de ROS que la glycolyse (Anandhan, Jacome, et al., 2017), et permettrait ainsi de répondre au besoin énergétique important des cellules cérébrales tout en conservant des conditions peu toxiques.

Compte tenu de leurs liens étroits avec la physiopathologie de la MP, les déficits mitochondriaux et le métabolisme énergétique de manière plus globale sont étudiés dans le cadre du développement de biomarqueur de la maladie. Notamment, leur apparition dès les premiers stades de la MP présenterait l'intérêt majeur de fournir des biomarqueurs de diagnostic précoce de la maladie.

## 2. Recherche de biomarqueurs : amélioration du diagnostic et de la prise en charge de la MP

La recherche de biomarqueur dans les biofluides a émergé depuis peu afin de développer de nouveaux outils diagnostic dans le cadre des maladies neurodégénératives. Cependant, ces biofluides doivent être accessibles de manière non ou peu invasive pour faciliter leur utilisation bien que le lien entre dérégulations cérébrales et modifications périphériques visible dans les biofluides ne soit pas toujours évident. Ainsi, les premières recherches de biomarqueurs se sont orientées vers le LCR compte tenu de son lien direct avec le système nerveux central. Notamment, une baisse de la concentration d'alpha-synucléine dans le LCR a été évoquée comme possible biomarqueur précoce de la maladie (Gao et al., 2015 ; Mollenhauer et al., 2019). Cependant, cette concentration n'est pas corrélée à la progression de la maladie. Bien que cette diminution puisse être un indice indirect des changements dans l'équilibre entre la sécrétion, la solubilité ou l'élimination de l'alpha-synucléine dans le cerveau, d'autres biomarqueurs plus directement liés à l'agrégation de l'alpha-synucléine et à la progression de la maladie sont nécessaires (Mollenhauer et al., 2019). De plus, d'autres marqueurs de la physiopathologie de la MP ont été mis en évidence dans le LCR comme par exemple des indicateurs de dérégulations mitochondriales, du métabolisme des acides gras ou du métabolisme énergétique de manière générale (Öhman & Forsgren, 2015; Trezzi et al., 2017; Trupp et al., 2014; Willkommen et al., 2018).

De façon intéressante, des analyses comparatives d'échantillons sanguins (plasma ou sérum) et de LCR ont montré des dérégulations communes et des performances similaires pour discriminer des patients parkinsoniens de sujets sains (Plewa et al., 2021; Stoessel et al., 2018; Trupp et al., 2014).

Les études sur l'ensemble de ces échantillons se sont donc multipliées et ont confirmé que l'ensemble des dysfonctionnements précédemment cités pouvait être retrouvés dans le sang, et permettre la distinction entre patient *de novo* et contrôle (Burté et al., 2017; Hatano et al., 2015; Lei & Powers, 2013; Nagesh Babu et al., 2018; Prigione et al., 2006; Smith et al., 2018; Toczyłowska et al., 2020; VITTE et al., 2004; Zhao et al., 2018).

D'ailleurs, cette distinction pourrait potentiellement être faite dès les stades les plus précoces de la MP. En effet, des études métabolomiques reportent notamment des altérations mitochondriales associées au stress oxydant chez des patients présentant

symptômes non moteurs semblables à ceux observés dans les phases précoces de la MP comme les troubles du sommeil REM ou des affections neuropsychiatriques (Quinones & Kaddurah-Daouk, 2009; Smith et al., 2018).

Bien que ces études restent au stade descriptif, elles ouvrent la voie pour le développement de biomarqueurs métaboliques potentiellement des phases précoces de la maladie, et ce à partir de biofluides facilement accessibles. Afin d'étudier plus spécifiquement la phase prodromale de la MP, de rares études ont été réalisées chez l'animal. Ainsi, des dérégulations au niveau du métabolisme des phospholipides et du cycle TCA ont été mises en évidence dans des modèles 6-OHDA, PFF ou roténone (Graham et al., 2018; Tyurina et al., 2015). Malheureusement, comme constaté chez l'homme, ces études restent pour la plupart au stade descriptif et se confrontent aux limites discutées précédemment pour chacun des modèles utilisés (voir chapitre 2 page 42).

Néanmoins, la preuve de concept apportée par ces études sur la pertinence d'utiliser la métabolomique de biofluides permet d'envisager la transposabilité des méthodes et des résultats de l'animal à la clinique. Notamment, l'utilisation de modèles animaux présente un réel intérêt pour l'étude de la phase prodromale qui sont plus difficilement accessibles chez l'homme. A ce jour, une seule étude s'est essayée à cette comparaison en recherchant des marqueurs sanguins simultanément chez des patients et des animaux parkinsoniens. Elle a ainsi montré que, parmi tous les marqueurs trouvés chez les patients au stade clinique, 23% était également observé dans la phase prodromale chez l'animal et pourraient donc être utilisés pour le diagnostic précoce de la MP (A. Kim et al., 2019).

Au-delà de son aspect diagnostique, la métabolomique pourrait également permettre de suivre l'évolution de la pathologie. En effet, des études métabolomiques du plasma, réalisées à 24 ou 36 mois d'intervalle, ont permis de prédire la vitesse d'évolution de la pathologie (Roede et al., 2013) ainsi que la progression du score UPDRS des patients (Lewitt et al., 2017). De plus, compte tenu des effets secondaires importants liés au traitement de la MP (voir chapitre 1 page 27), plusieurs études se sont focalisées sur la prédiction du risque de développer ces effets secondaires. Ainsi, il a été mis en évidence un lien étroit entre le risque de développer des dyskinésies suite à la prise de L-DOPA et le métabolisme de la kynurénine (Shao & Le, 2019). Ce type de découverte pourrait permettre une prise en charge

personnalisée et donc mieux adaptée à chaque patient, ce qui permettrait d'améliorer leur quotidien.

La métabolomique représente donc un outil puissant pour le développement de biomarqueurs précoces de la MP. En effet, par rapport aux méthodes diagnostiques actuellement utilisées en clinique telle que l'imagerie, la métabolomique peut être appliquée sur des biofluides facilement accessibles, et donc de manière non invasive et moins coûteuse. De plus, l'utilisation d'échantillons comme le sang permet de transposer facilement les méthodes d'analyse, les hypothèses, et les résultats, de l'animal à l'homme.





# Problématique et objectifs de travail

Les travaux scientifiques présentés au cours de la partie précédente ont largement mis en lumière les limitations quant au diagnostic et à la prise en charge de la MP. Aujourd'hui, aucun traitement ne permet de prévenir ou de ralentir l'évolution de la MP. Bien que de multiples tentatives de neuroprotection se soient révélées prometteuses sur un plan préclinique, elles ont échoué chez le patient car appliquées trop tardivement. En effet, le diagnostic de la MP repose actuellement sur l'apparition tardive des symptômes moteurs. Ainsi, la détection plus précoce de la MP représente un enjeu majeur pour le développement de nouveaux traitements et notamment de traitements curatifs.

Par ailleurs, bien que les patients puissent présenter des symptômes neuropsychiatriques durant les phases précoces de la maladie, ils ne sont pas exclusifs de la MP. En effet, ils se retrouvent dans d'autres pathologies neurologiques (Huntington, Alzheimer, dépression...) et ne permettent donc pas d'établir un diagnostic précoce spécifique de la maladie.

Des altérations du métabolisme au niveau cérébral, mais également au niveau sanguin, ont été identifiées chez des patients atteints de la MP et chez des patients présentant des symptômes neuropsychiatriques semblables à ceux observés dans la MP. Néanmoins, à ce jour, aucune étude métabolique ne s'est intéressée aux troubles neuropsychiatriques et à la MP de façon conjointe, ce qui pourrait permettre d'accéder à la phase prodromale de la MP. Finalement, la comparaison du profil métabolique à différents stades de la pathologie, et notamment dès les phases précoces, pourrait non seulement servir d'outil diagnostique, mais également permettre d'identifier des cibles pertinentes pour le développement de stratégies thérapeutiques.

Dans ce contexte, mon travail doctoral s'est articulé autour de deux axes principaux qui avaient pour objectif :

**1. De trouver une signature métabolique sanguine spécifique des différentes phases de la MP :**

Tout d'abord à partir de modèles animaux complémentaires afin d'accéder aux stades les plus précoces de la maladie, notamment en caractérisant les troubles neuropsychiatriques associés. Puis dans un second temps de confronter nos observations à la clinique en comparant ces dérégulations spécifiques à l'animal, à celles mesurés dans des échantillons de patient *de novo*. L'objectif final étant de développer un biomarqueur sanguin capable de

détecter le phénotype de la MP à la fois chez les animaux et chez le patient, dès les phases précoces.

**2. D'utiliser les signatures métaboliques obtenues pour approfondir nos connaissances sur la physiopathologie de la MP et identifier une ou des cibles thérapeutiques potentielles :**

Dans un premier temps en étudiant les dérégulations métaboliques au niveau cérébral, au sein même des structures impliquées dans la MP à savoir le striatum dorsal et le noyau accumbens chez les animaux 6-OHDA. Puis dans un second en en modulant l'activité d'enzymes associées aux dérégulations métaboliques observées, afin de reproduire ces dérégulations chez l'animal sain et dans le modèle 6-OHDA.



# Approches expérimentales principales

Plusieurs approches expérimentales ont été utilisées afin de répondre aux objectifs précédemment décrits. Ainsi, dans la partie qui suit, je m'attacherai à décrire l'aspect théorique ainsi que la démarche scientifique que nous avons suivie pour mener à bien l'ensemble de mes travaux de thèse. Les informations techniques seront quant à elles décrites dans les parties Matériel et Méthodes des différents articles scientifiques.

Afin de **de trouver une signature métabolique sanguine spécifique des différentes phases de la MP**, nous avons mis en place une approche originale, consistant à rechercher, dans le métabolome sanguin, les molécules communément dérégulées à la fois dans trois différents modèles animaux de la MP et dans trois cohortes de patients de novo.

Nous avons donc étudié les changements métaboliques dans deux modèles complémentaires de rongeurs et un modèle de primate non humain, exprimant des caractéristiques complémentaires de la MP (Bourdenx et al., 2015; Drui et al., 2014; Seo et al., 2019). Nous avons d'abord utilisé le modèle de rat 6-OHDA, basé sur une injection bilatérale au niveau de la SNc, induisant une neurodégénérescence permettant de mimer de manière stable, et sans évolution temporelle chez un même animal, un stade spécifique de la maladie, y compris la phase prodromale (Drui et al., 2014; Magnard et al., 2016). Cela nous a permis de comparer à un temps donné les différentes phases de la MP, de la même manière qu'une étude clinique comparant des patients atteints de la MP à différents stades. Afin de caractériser et de classer les animaux dans ces différentes phases, au-delà de l'analyse histologique, plusieurs tests comportementaux ont été réalisés. Notamment, nous avons évalué les comportements de type apathique (pouvant apparaître dès la phase préclinique chez les patients) via l'auto-administration de sucrose (Balleine and O'Doherty, 2010), et également mesuré les capacités motrices fines des animaux grâce au test du réajustement du pas, afin de mettre en lumière la présence ou non de troubles moteurs spécifiques des phases plus avancées de la MP (Olsson et al., 1995). Par la suite, nous avons utilisé un modèle de rat alpha-synucléine induit par un vecteur viral, qui présente une synucléinopathie et offre l'avantage d'une expression progressive du vecteur reflétant la nature progressive de la MP au sein d'un même individu (Bourdenx et al., 2015). Néanmoins, ce modèle n'englobe pas tous les symptômes neuropsychiatriques caractéristiques du stade prodromal de la MP, telle que l'apathie (Caudal et al., 2015). Enfin, nous avons utilisé le modèle de primate non humain

MPTP qui présente une plus grande homologie de séquence génomique avec les humains et d'importantes similitudes neuroanatomiques et symptomatologiques.

Nous avons réalisé des prélèvements de sang sur l'ensemble de ces animaux, avec notamment des prélèvements longitudinaux sur le modèle alpha-synucléine afin de tenir compte de son évolution temporelle. Les sérums ont par la suite été analysés par RMN afin de mettre en évidence les métabolites communément dérégulés.

De plus, le modèle 6-OHDA ayant une bonne valeur prédictive des traitements classiquement utilisés en clinique, tels que les agonistes dopaminergiques (Favier et al., 2014), nous avons mesuré les effets d'un traitement au Pramipexole sur le métabolome sanguin des animaux.

Nous avons ensuite réalisé le même type d'analyse métabolomique sur des échantillons issus de 3 cohortes de patient *de novo*, une provenant des États-Unis, et l'autre d'Italie. Notre stratégie innovante a consisté en la mise en commun des résultats obtenus à la fois chez l'animal et l'homme, afin de présélectionner une liste restreinte de métabolites candidats pour le développement d'un biomarqueur. Nous souhaitons en effet réduire le nombre de métabolites afin de proposer un biomarqueur plus explicite, plus facilement mesurable par différentes méthodes analytiques, et plus facilement manipulable qu'un profil métabolique global incluant tout le spectre RMN.

Ainsi, afin de sélectionner les métabolites communément dérégulés chez l'animal et l'homme à partir des profils métaboliques globaux, nous avons retenu les métabolites étant significativement modifiés entre les phénotypes MP et contrôles dans au moins 3 des 4 groupes étudiés.

Ce premier objectif a fait l'objet de l'étude 1, étude translationnelle, qui a permis de mettre en évidence 6 métabolites communément dérégulés dans les modèles animaux et chez l'homme. Ces 6 métabolites ont été combinés selon une régression spécifique, pour les modèles animaux et pour l'homme de manière indépendante. En effet, les données animales et humaines ont été traitées séparément au vu des niveaux différents de métabolites observés dans le sérum, probablement lié à l'impact de facteurs extérieurs tel que le style de vie ou la nutrition, moins contrôlés pour les hommes que pour les animaux de laboratoire. Cela a conduit au développement d'un biomarqueur permettant une bonne discrimination entre les groupes contrôles et les groupes de type parkinsoniens à la fois dans les modèles animaux et



chez l'homme à travers les différentes cohortes. Cette étude a donné lieu à une publication : Mallet. et al. (2021) *Journal of Clinical Investigation* « **A metabolic biomarker for early stage of Parkinson's disease in patients and animal models**» (e146400. doi: 10.1172/JCI146400), et au dépôt d'une demande de brevet (BNT230419FR00).

L'ensemble des dérégulations observées entre les différents modèles ou cohortes nous a permis par la suite d'émettre différentes hypothèses sur l'étiologie de la MP. Ainsi, dans le but « d' **approfondir nos connaissances sur la physiopathologie de la MP et identifier une ou des cibles thérapeutiques potentielles** » à partir des données métabolomiques, nous avons dans un premier temps mesuré chez le rat 6-OHDA les dérégulations métaboliques dans deux structures cérébrales impactées dans la MP, c'est à dire le striatum dorsal et le noyau accumbens. L'étude de ces structures avait pour but de se focaliser sur le système nerveux central, par rapport à l'analyse du sérum. Ces analyses, réalisées par RMN HRMAS, ont permis de confirmer certaines dérégulations sanguines. La mise en commun de ces données HRMAS avec celles décrites dans l'étude sur le biomarqueur, associée à des expériences supplémentaires de biologie cellulaire, nous a permis d'émettre plusieurs hypothèses quant aux dérégulations potentiellement impliquées dans la physiopathologie de la MP. Notamment, nous avons identifié la dérégulation de nombreux acteurs du métabolisme énergétique, et plus particulièrement du métabolisme du pyruvate, qui, en tant que point central entre glycolyse et cycle TCA, pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle. Parmi les points clés du métabolisme du pyruvate, le transporteur mitochondrial du pyruvate (MPC) a particulièrement retenu notre attention pour la suite de nos travaux. En effet, l'utilisation d'une nouvelle classe d'antidiabétiques sensibilisateurs à l'insuline permettant son inhibition, s'est récemment avérée potentiellement neuroprotectrice dans différents modèles neurotoxiques et génétiques de neurodégénérescence pertinents pour la MP (Ghosh et al., 2016; Quansah et al., 2018; Tang, 2019). Ainsi, dans le but de reproduire les dérégulations métaboliques précédemment observées, nous avons bloqué le MPC chez l'animal dans un contexte parkinsonien, via un traitement chronique au MSDC-0160 (sensibilisateur à l'insuline) (Colca et al., 2014). Nous avons mesuré l'effet du traitement du MSDC-0160 sur la dénervation dopaminergique induite par la 6-OHDA, et au niveau comportemental via le test du cylindre. De plus, dans le but de cartographier plus précisément les processus induits par le traitement au MSDC-0160, des analyses post mortem par western-blot des enzymes clés du métabolisme

énergétique ont été réalisées au niveau du striatum dorsal. Enfin ces analyses ont été couplées à des mesures RMN du métabolome sérique.

L'ensemble de ces résultats a constitué l'étude 2 de ce manuscrit, qui nous a permis de confirmer l'effet neuroprotecteur du MSDC-0160 et proposer l'hypothèse que cette neuroprotection pourrait être liée à une adaptation métabolique utilisant notamment les lipides et les corps cétoniques comme source alternative d'énergie. Ces résultats sont à l'origine d'une seconde publication actuellement soumise à *Molecular Neurobiology* : Mallet. et al., under review «**Re-routing metabolism by the mitochondrial pyruvate carrier inhibitor MSDC- 0160 attenuates neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease**».



# Résultats

---

Mes résultats seront présentés sous la forme de deux publications en tant que premier auteur, la première acceptée et la seconde soumise.

La première partie sera consacrée à la présentation de l'étude métabolomique inter-espèce chez l'animal et le patient, qui a conduit au développement d'un biomarqueur pour la MP et aboutit à la publication de l'article « **A metabolic biomarker for early stage of Parkinson's disease in patients and animal models** » en 2021 dans *Journal of Clinical Investigation* (e146400. doi: 10.1172/JCI146400), et au dépôt d'une demande de brevet (BNT230419FR00).

La seconde partie présentera les résultats décortiquant les mécanismes d'action du MSDC-0160 dans un contexte parkinsonien et sera présentée sous la forme d'un manuscrit « **Re-routing metabolism by the mitochondrial pyruvate carrier inhibitor MSDC- 0160 attenuates neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease** » under review pour publication dans *Molecular Neurobiology*

## A. Article I - A metabolic biomarker for early stage of Parkinson's disease in patients and animal models

**Contexte et objectifs :** La prise en charge des patients atteints de la maladie de Parkinson reste actuellement symptomatique, principalement parce que son diagnostic, qui repose sur l'expression des symptômes moteurs cardinaux, est posé trop tard. En effet, ces symptômes apparaissent alors que le processus neurodégénératif est déjà très avancé (50-60% des neurones de la SNc sont déjà morts). De manière intéressante, des altérations du métabolisme cérébral, mais également du métabolisme sanguin, ont été identifiées chez des patients atteints de la MP, et chez des patients présentant des symptômes neuropsychiatriques semblables à ceux observés dans les phases précoces de la MP. Nous avons donc étudié les altérations du métabolisme associées aux différentes phases de la maladie, et notamment aux phases précoces.

**Méthodologies :** Nous avons étudié les marqueurs métaboliques dans trois modèles animaux différents de la MP, imitant les différentes phases de la maladie, déterminées par une évaluation comportementale et histologique, et dans 3 cohortes de patients comprenant des patients de novo et des sujets sains. Des échantillons de sérum et de tissu cérébral ont été analysés par résonance magnétique nucléaire et les données ont été soumises à des statistiques multivariées avancées.

**Principaux résultats :** Notre stratégie translationnelle a révélé des dérégulations métaboliques communes dans le sérum des différents modèles animaux et des patients atteints de la MP. Certaines d'entre elles se retrouvent dans les échantillons de tissus, reflétant peut-être des mécanismes physiopathologiques associés au développement de la MP. De plus certaines dérégulations métaboliques chez l'animal sont apparues avant l'émergence des symptômes moteurs et pourraient donc représenter des biomarqueurs précoces de la MP.

Ainsi, nous avons construit un biomarqueur composite basé sur une combinaison de 6 métabolites. Ce biomarqueur a permis de distinguer les animaux mimant la maladie de Parkinson des animaux contrôles dès les phases précoces (VPP = 90,0 et VPN = 87,2) et les patients de novo des sujets sains (VPP = 80,2 et VPN = 79,07).

**Conclusion** : A partir de notre étude translationnelle qui a inclus trois modèles animaux et trois cohortes de patients atteints de la MP de novo, nous proposons donc un biomarqueur sanguin présentant une grande précision pour le diagnostic de la maladie de Parkinson. Ce biomarqueur pourrait même se révéler efficace de manière précoce avant même l'apparition des symptômes moteur.

## A metabolic biomarker predicts Parkinson's disease at the early stages in patients and animal models

David Mallet, ... , Florence Fauvelle, Sabrina Boulet

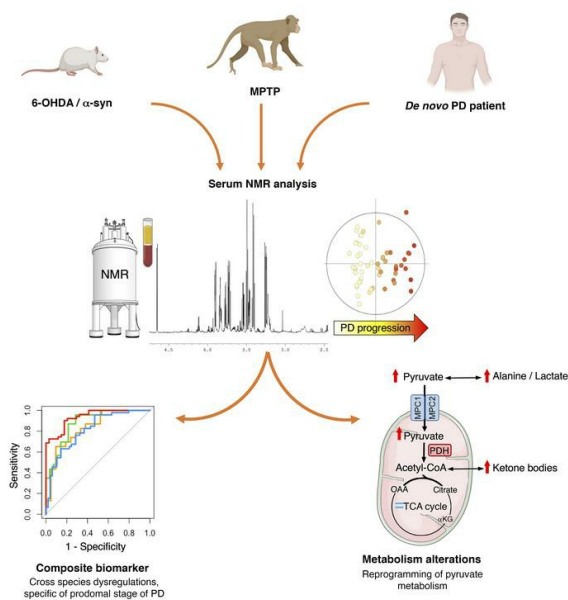
*J Clin Invest.* 2022;132(4):e146400. <https://doi.org/10.1172/JCI146400>.

Clinical Medicine

Metabolism

Neuroscience

### Graphical abstract



Find the latest version:

<https://jci.me/146400/pdf>





# A metabolic biomarker predicts Parkinson's disease at the early stages in patients and animal models

David Mallet,<sup>1</sup> Thibault Dufourd,<sup>1</sup> Méлина Decourt,<sup>2</sup> Carole Carcenac,<sup>1</sup> Paola Bossù,<sup>3</sup> Laure Verlin,<sup>4</sup> Pierre-Olivier Fernagut,<sup>2</sup> Marianne Benoit-Marand,<sup>2</sup> Gianfranco Spalletta,<sup>5</sup> Emmanuel L. Barbier,<sup>1,4</sup> Sebastien Carnicella,<sup>1</sup> Véronique Sgambato,<sup>6</sup> Florence Fauvelle,<sup>1,4</sup> and Sabrina Boulet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University Grenoble Alpes, INSERM, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, Grenoble, France. <sup>2</sup>Université de Poitiers, INSERM U1084, Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, Poitiers, France. <sup>3</sup>Dipartimento di Neurologia Clinica e Comportamentale, Laboratorio di Neuropsicobiologia Sperimentale, IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome, Italy. <sup>4</sup>University Grenoble Alpes, INSERM, US17, CNRS, UMS 3552, CHU Grenoble Alpes, IRMaGe, Grenoble, France. <sup>5</sup>Laboratory of Neuropsychiatry, IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome, Italy. <sup>6</sup>Université de Lyon, CNRS UMR5229, Institut des Sciences Cognitives Marc Jeannerod, Bron, France.

**BACKGROUND.** Care management of Parkinson's disease (PD) patients currently remains symptomatic, mainly because diagnosis relying on the expression of the cardinal motor symptoms is made too late. Earlier detection of PD therefore represents a key step for developing therapies able to delay or slow down its progression.

**METHODS.** We investigated metabolic markers in 3 different animal models of PD, mimicking different phases of the disease assessed by behavioral and histological evaluation, and in 3 cohorts of de novo PD patients and matched controls ( $n = 129$ ). Serum and brain tissue samples were analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy and data submitted to advanced multivariate statistics.

**RESULTS.** Our translational strategy reveals common metabolic dysregulations in serum of the different animal models and PD patients. Some of them were mirrored in the tissue samples, possibly reflecting pathophysiological mechanisms associated with PD development. Interestingly, some metabolic dysregulations appeared before motor symptom emergence and could represent early biomarkers of PD. Finally, we built a composite biomarker with a combination of 6 metabolites. This biomarker discriminated animals mimicking PD from controls, even from the first, nonmotor signs and, very interestingly, also discriminated PD patients from healthy subjects.

**CONCLUSION.** From our translational study, which included 3 animal models and 3 de novo PD patient cohorts, we propose a promising biomarker exhibiting a high accuracy for de novo PD diagnosis that may possibly predict early PD development, before motor symptoms appear.

**FUNDING.** French National Research Agency (ANR), DOPALCOMP, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Grenoble Alpes, Association France Parkinson.

## Introduction

Parkinson's disease (PD) is one of the most prevalent neurodegenerative diseases in the world, affecting about 1% of adults older than 60 years (1). From its onset, the pathology evolves progressively and continuously according to 3 stages, i.e., preclinical, prodromal, and clinical, corresponding, respectively, to the asymptomatic onset of neurodegeneration, nonmotor symptoms, and motor symptoms (2), finally allowing the diagnosis to be made (3). Unfortunately, the motor symptoms appear when 70% to 80%

of the nigrostriatal dopamine system is already lost (1), precluding any potential neuroprotective intervention (4). Furthermore, postmortem and histopathological analyses show that the accuracy of current PD diagnosis is only 53% in patients with motor symptoms occurring for less than 5 years (5). In the early phases of PD, the prodromal phase is characterized by a panel of nonmotor symptoms, including neuropsychiatric disorders, such as apathy, which could schematically be defined as a loss of motivation (6), observed in up to 70% of PD patients (7). Although these symptoms are often premonitory of PD, they are not specific and therefore cannot be considered as predictive criteria. Thus, finding reliable, specific, and highly predictive biomarkers of the prodromal stage of the disease is a substantial challenge for the success of PD curative or preventive strategies and for the development of therapies able to delay or slow down PD progression (8, 9).

PD is a multifactorial disease (10) resulting from a complex interplay between genetic and environmental factors. The metabolome — the global pool of metabolites — reflects the interactions

**Authorship note:** FF and SB are co-senior authors.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Copyright:** © 2022, Mallet et al. This is an open access article published under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

**Submitted:** December 1, 2020; **Accepted:** December 15, 2021;

**Published:** February 15, 2022.

**Reference information:** *J Clin Invest.* 2022;132(4):e146400.

<https://doi.org/10.1172/JCI146400>.

among genotype, lifestyle, diet, drug therapy, and environmental exposure (11). Therefore, metabolomics, i.e., metabolome analysis, could represent a powerful tool for elucidating the molecular mechanisms involved in PD and identifying potential predictive biomarkers (12–14). Metabolic alterations have already been described in patients expressing neuropsychiatric symptoms similar to those observed in the prodromal stage of PD (15). Additionally, it has been shown that the metabolic dysregulation observed in serum can accurately discriminate newly diagnosed PD patients from controls (16). Similarly, alterations in plasma metabolome have been correlated with disease progression in PD patients (17). However, the use of metabolomics as a predictive tool during the prodromal stage remains to be investigated.

To study this prodromal stage, animal models of PD have been widely developed (18), but none is currently able to recapitulate all phenotypic and etiological characteristics of the disease. We therefore investigated potential metabolic changes in 3 different animal models, namely, 2 complementary rodent models and 1 nonhuman primate model expressing complementary PD characteristics (19–21). We first used the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat model, as it represents a gold standard and phenotypically correct model of PD, with each animal stably mimicking a specific stage of the disease, including the prodromal phase, without temporal evolution (18, 19). This allows capture of the nature of the disorder in a between-group design at a given time, similarly to a clinical study comparing PD patients at different stages of the disease. Moreover, it has good predictive value regarding the treatments classically used in clinics, such as dopaminergic agonists (22). We then used a viral vector-induced  $\alpha$ -synuclein rat model that presents progressive synucleinopathy reflecting the progressive nature of PD in a within-group design. Nonetheless, this model does not encompass all the neuropsychiatric symptoms characteristic of the prodromal stage of PD (e.g., apathy; ref. 23). Finally, we used the nonhuman 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) primate model, which shares greater genome sequence identity with humans and neuroanatomical similarities (Figure 1). Metabolic changes were analyzed in blood (serum) to find biomarkers that are easily transposable to the clinic and in specific brain regions differently affected by the neurodegenerative process (i.e., the dorsal striatum [DS] and nucleus accumbens [Nacc]) to potentially associate these biomarkers with the pathophysiological processes involved in PD. We thereby built a blood biomarker from a combination of metabolites that might be relevant to the prodromal stage. From a translational perspective and in order to validate the clinical relevance of our PD biomarker candidate, we compared our preclinical results with the metabolomic results of de novo PD patients from 2 different biobanks.

## Results

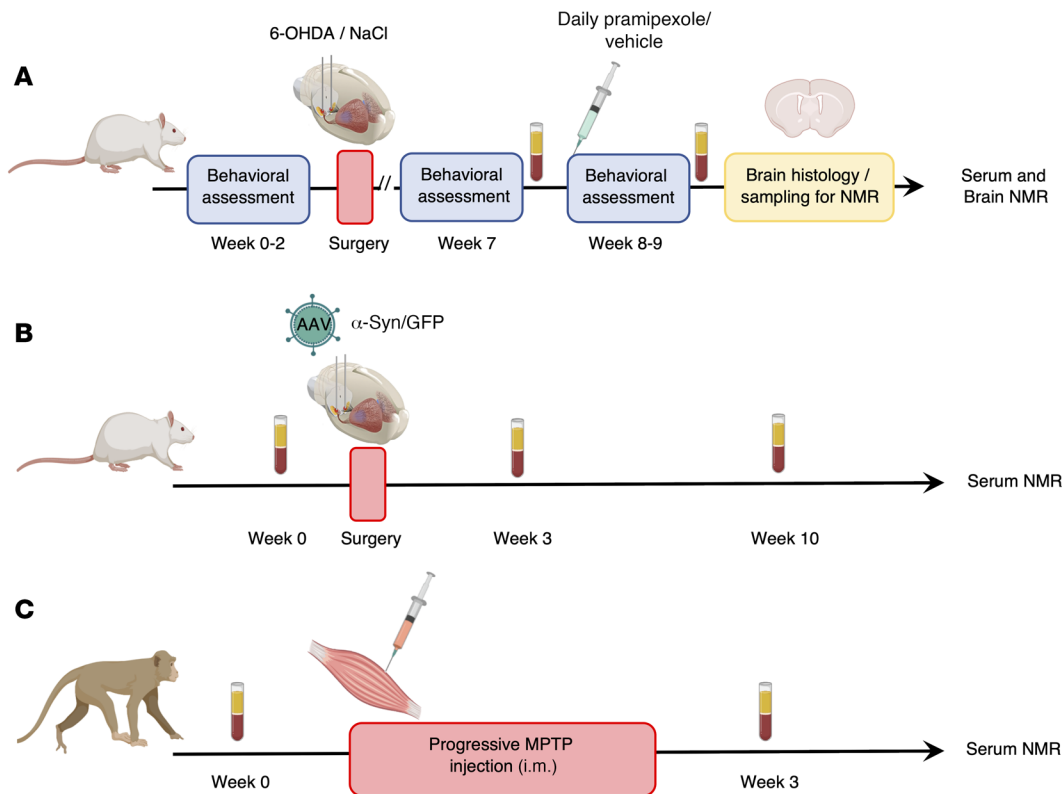
*The 6-OHDA rat model allows the study of different stages of PD.* Although PD diagnosis in humans relies on a scale that integrates evaluations of both neuropsychiatric and primarily motor symptoms (24), its final confirmation relies on postmortem histological evaluations that include dopaminergic loss in the nigrostriatal pathway, leading to denervation of the DS, and the presence of  $\alpha$ -synuclein containing Lewy bodies. In order to categorize each 6-OHDA rat presenting its own PD phenotype without temporal evolution

of its symptoms and its dopaminergic lesions in a subgroup corresponding to a specific disease stage (i.e., prodromal-like or clinical-like), we established a score, called the Parkinson's disease progression (PDP) score. The PDP score was based on the same kind of criteria used for patients, i.e., (a) the neuropsychiatric component, evaluated by operant self-administration performances (motivation); (b) fine motor capacities, evaluated by stepping test performances; (c) and extent of the DS lesion, evaluated by post-mortem histological analysis. Based on this score, we assigned the PD animals to 2 categories, prodromal-like or clinical-like. These terms will be used throughout the study (Figure 2A).

Tyrosine hydroxylase immunoreactivity (TH-IR) revealed that bilateral 6-OHDA injection in the substantia nigra pars compacta (SNc) led to a partial nigrostriatal dopaminergic lesion resulting in dopaminergic denervation in the DS and, to a lesser extent, in the Nacc (Figure 2, B and C). Indeed, TH-IR quantification showed a significant loss (62.2%;  $P \leq 0.001$ ) of dopaminergic projections in the DS of prodromal-like animals compared with sham-operated animals, with a greater loss in clinical-like animals (71.96%). A slight loss of TH-IR was also observed in the Nacc of 6-OHDA animals (Figure 2C). This denervation pattern preserves learning and global ambulatory activity of animals (19), allowing study of motivational processes without the potential bias related to locomotor alterations often present in PD animal models (refs. 19, 22, and Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/JCI146400DS1>). Motivation was measured by a sucrose self-administration procedure. Prior to surgery, rats learned the motivation task and reached their maximum performance level (about 80 rewards per 1-hour session). After surgery, the performances of sham-operated rats remained stable, while those of 6-OHDA animals dramatically decreased (30%–66%; Figure 2D). Regarding fine motor skills, the 6-OHDA infusion did not reduce the number of adjusting steps, except in the clinical-like group, where it strongly decreased (Figure 2E). We then investigated the metabolic dysregulations of each animal in association with its PDP score, i.e., its PD stage.

*Serum metabolic signature coevolves with PD progression in 6-OHDA rats.* Figure 3A illustrates a typical proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR) spectrum of 6-OHDA rat serum, acquired at an ultrahigh magnetic field (23T). This allowed the identification of approximately 50 metabolites (Supplemental Table 2). The score plot of the orthogonal partial least squares (OPLS) analysis, performed with the NMR data and PDP scores for each animal (i.e., the 6-OHDA serum OPLS model) shows a clear gradation of dot colors from “cold” (light yellow) on the left to “hot” (red) on the right. This indicates that the metabolic profile coevolves with disease progression (Figure 3B).

The animals were assigned to different disease-stage groups afterwards, according to their individual PDP scores, in order to mimic a clinical approach (see Methods). Among the 14 metabolites with a correlation with PDP score of 0.5 or more in the OPLS (Figure 3C), we found that 10 were modified in at least 1 PD-like group compared with those in sham-operated animals (Figure 3D): alanine, betaine,  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB), dimethyl sulfone (DMSO<sub>2</sub>), glycine, lactate, pyruvate, threonine, serine, and valine. These metabolites did not evolve identically with disease progression. First, 6 metabolites were modified in the prodromal-like stage:



**Figure 1. Flowchart of experimental procedures applied to different PD animal models. (A–C)** All serum samples were collected after fasting and following the same protocol. They were analyzed by  $^1\text{H}$ -NMR at 950 MHz. Brain samples of 6-OHDA rats were used for histology and metabolomic analysis performed by  $^1\text{H}$  HRMAS NMR at 500 MHz.

alanine, BHB, glycine, lactate, and serine increased, while betaine decreased. Their levels then remained stable in the clinical-like stage. Secondly, pyruvate progressively increased as PD progressed. Finally, 3 metabolites were only modified at the clinical-like stage: DMSO2 and valine decreased, while threonine increased (Figure 3D). Thus, metabolic dysregulations observed in the sera of 6-OHDA rats could be highly predictive of each PD-like stage.

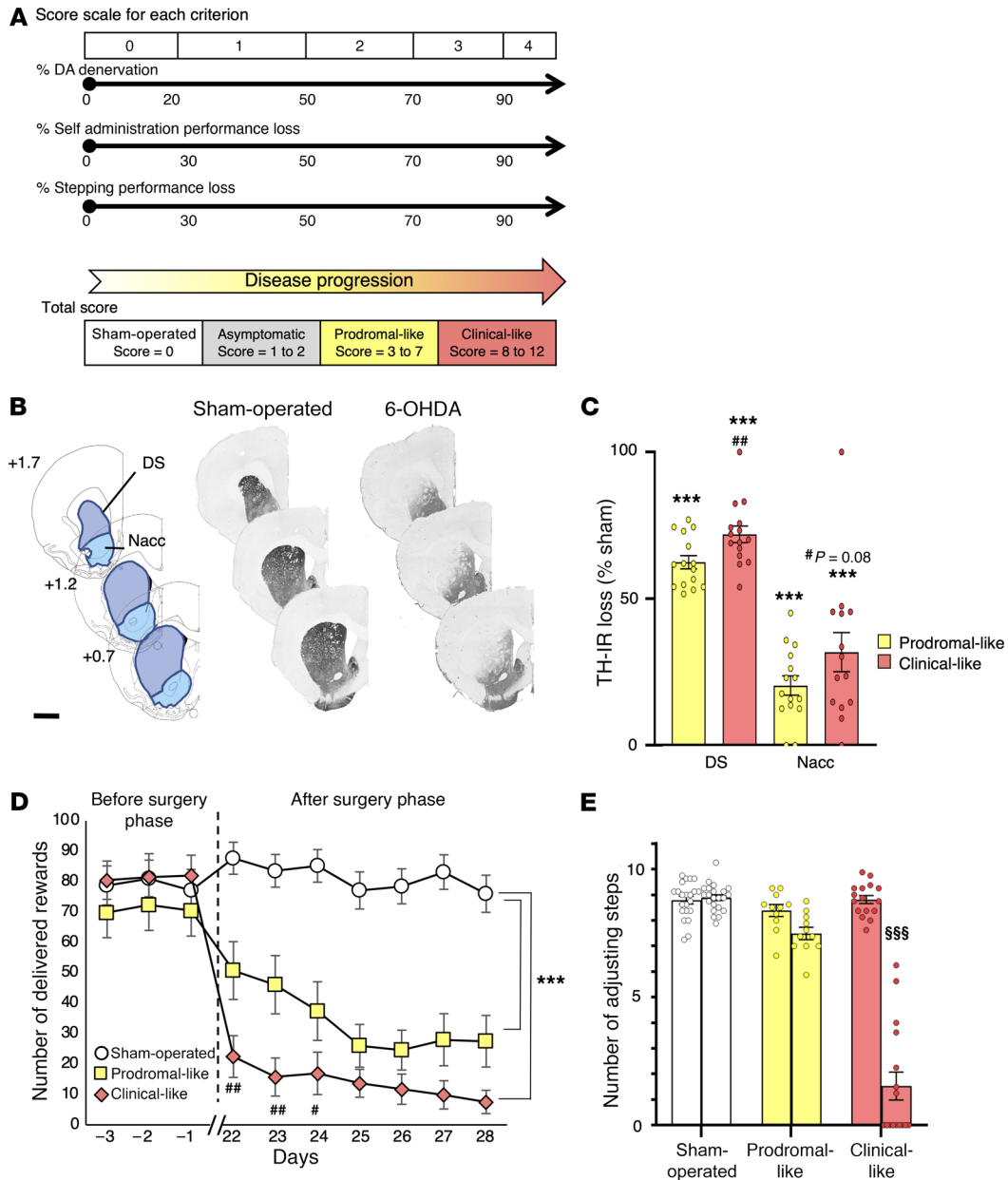
*Brain tissue metabolic profiles in the 6-OHDA rat model reflect dysregulations in serum.* Proton high-resolution magic angle spinning ( $^1\text{H}$  HRMAS) NMR spectroscopy was used to investigate the metabolic profiles of unprocessed brain biopsies (DS and Nacc) from 6-OHDA animals, sampled at the same levels as the sections used for histology to quantify dopaminergic denervation. A representative spectrum of a DS biopsy from a 6-OHDA rat is shown in Figure 4A, with labeling of assigned and quantified metabolites. Regarding DS samples, the OPLS analysis (i.e., the 6-OHDA DS OPLS model) revealed that cerebral metabolic profiles coevolved with individual PDP scores, as in serum (Figure 4B). The significant dysregulations of key metabolites are illustrated in Figure 4C. Compared with those in sham-operated animals, one metabolite, taurine, was significantly increased in the prodromal-like group ( $P \leq 0.05$ ), while 4 metabolites were significantly modified in the clinical-like group: alanine, lactate, phosphocreatine and creatine (PCR) increased, and glutamate decreased.

The OPLS analysis of Nacc data (i.e., the 6-OHDA Nacc OPLS model) showed the same trend, although less clearly (Figure 4D).

The univariate statistics revealed a substantial increase of alanine and lactate in the prodromal-like group, whereas the clinical-like group was characterized by an increase of phosphocholine (PC) and a decrease of choline compared with that in sham-operated animals (Figure 4E). These experiments show that both alanine and lactate exhibit similar dysregulation between serum and brain.

*Pramipexole partially reverses serum and tissue metabolic dysregulations induced by 6-OHDA.* We further evaluated whether the serum metabolic profile could be influenced by the use of pramipexole (Pra), a widely used dopaminergic treatment in newly diagnosed PD patients that is known to improve only neuropsychiatric symptoms at low doses in animal models (22, 25). As expected, after 15 days of subchronic administration of Pra, the deficits in the self-administration task measured in 6-OHDA rats were fully and partially reversed in prodromal-like and clinical-like animals, respectively. In contrast, the performances of rats treated with vehicle (Veh) did not improve (Figure 5A).

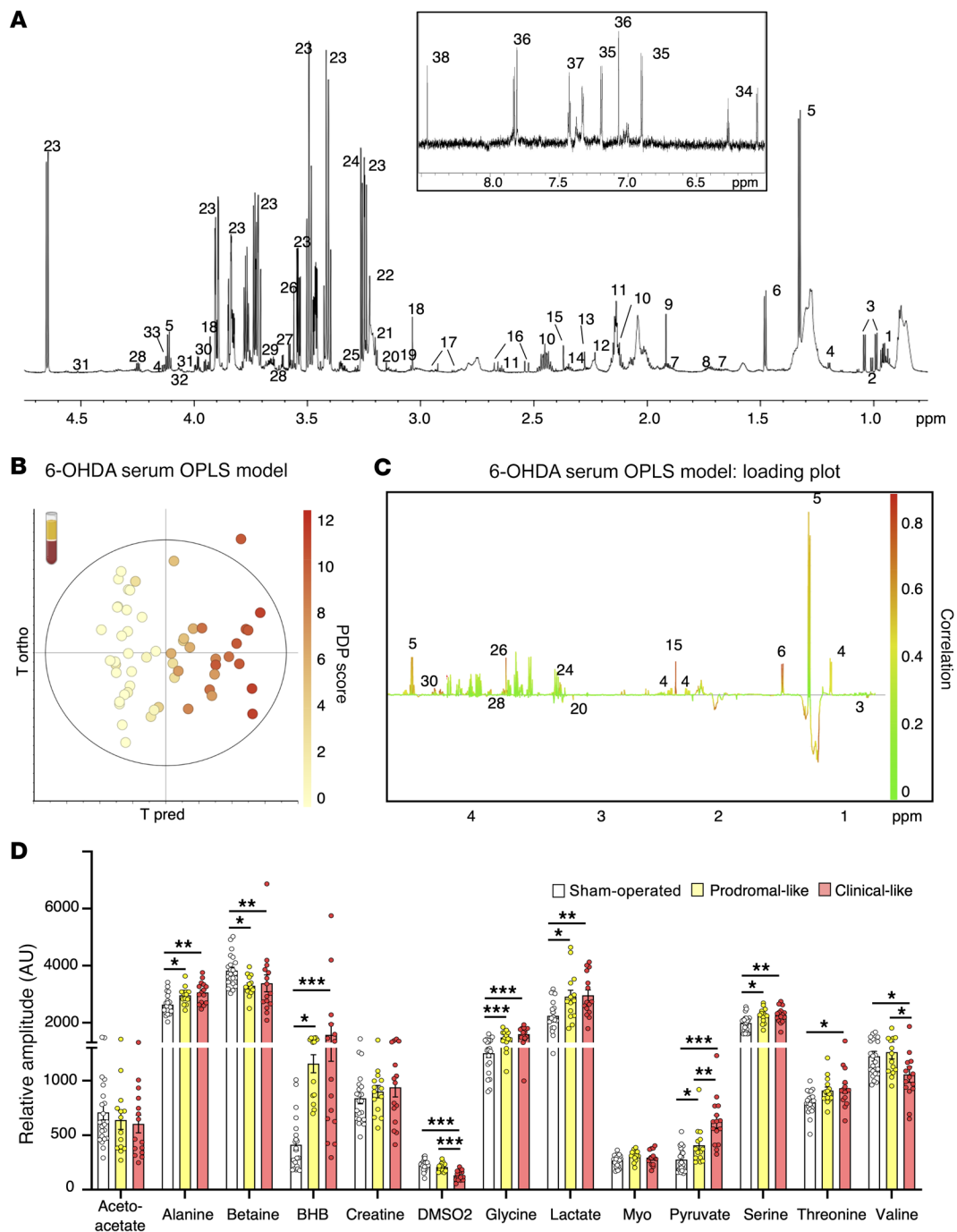
Concerning the serum metabolic profiles, to simultaneously visualize the effect of the 6-OHDA lesion and the treatment, the metabolite levels of prodromal-like animals were normalized to their levels in sham-operated animals (lesion effect) or in lesioned animals given Veh (Pra effect). In prodromal-like animals, the alanine, BHB, and pyruvate levels increased after lesion (Figure 3D and Figure 5B) and were significantly decreased by Pra (Figure 5B), while betaine decreased after lesion, but increased in Pra animals. In the clinical-like group, metabolic reversion induced by



**Figure 2. Striatal dopaminergic denervation induced by bilateral 6-OHDA lesion of the SNc leads to apathetic-like behavior and fine motor dysfunctions.** (A) A PDP total score, as the sum of histological and behavioral components, was assigned to each animal, from 0 (sham-operated animal) to 3 to 7 (prodromal-like animal) or 8 to 12 (clinical-like animal). (B) Examples of TH-stained coronal sections of sham-operated and 6-OHDA rat brains at 3 striatal levels with respect to bregma and corresponding diagrams selected from the atlas of Paxinos and Watson (79), with areas used for quantification of dopaminergic denervation. Scale bar: 2 mm. (C) Quantification of TH-IR staining loss at the striatal levels shown in B, expressed as a percentage of the mean value obtained for sham-operated animals ( $n = 22$ ). We observed a large decrease of TH-positive neurons in DS and a lighter decrease in Nacc of prodromal ( $n = 14$ ) and clinical-like ( $n = 15$ ) rats. (D) 6-OHDA SNc lesion induced an abrupt instrumental deficit in an operant sucrose self-administration procedure. Results are expressed as the mean number of sucrose deliveries per session. Sham-operated rats ( $n = 22$ ); prodromal-like rats ( $n = 14$ ); clinical-like rats ( $n = 15$ ). (E) 6-OHDA SNc lesion reduced the number of adjusting steps in a stepping procedure only in clinical-like animals. Results are expressed as the mean number of forelimb adjustments for 2 trials before (left bars) and after (right bars) 6-OHDA (prodromal-like ( $n = 14$ ) and clinical-like ( $n = 15$ ) animals or saline (sham) injection ( $n = 22$ ). Data are presented as mean  $\pm$  SEM and were determined by 1-way ANOVA or RM-ANOVA followed by Tukey's post hoc or Šidák's test.  $***P \leq 0.001$ , compared with sham-operated animals;  $##P \leq 0.01$ , clinical-like compared with prodromal-like;  $\#P < 0.05$ ;  $$$$P \leq 0.001$ , before surgery compared with after surgery.

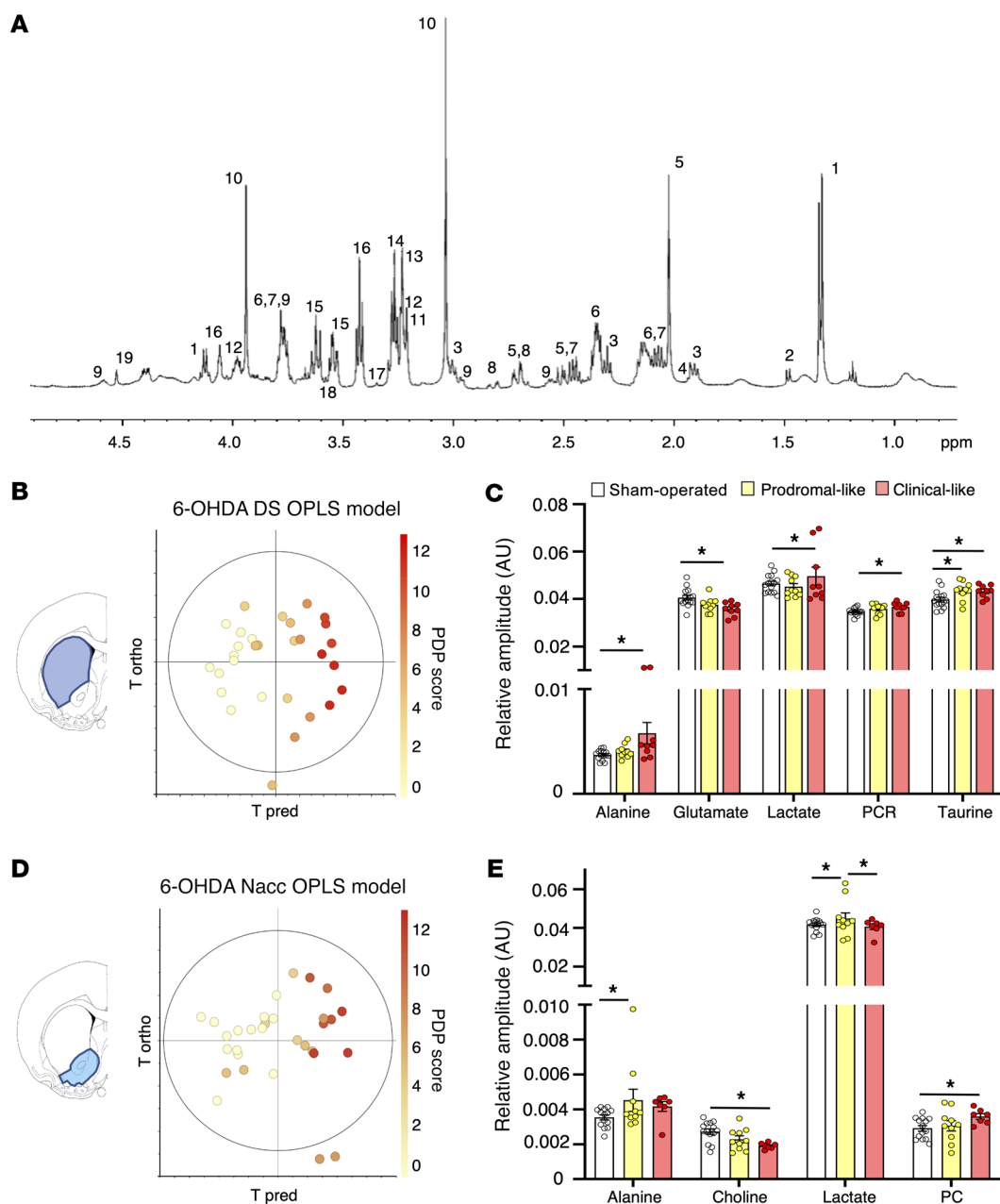
Pra was very limited and concerned only alanine. This is consistent with the modest behavioral reversion observed (slight effect on the self-administration task and no effect on the motor task; ref. 25, data not shown).

In contrast to serum, for which several longitudinal samples could be taken in the same animal, brain samples could only be collected at the end of the experiment, when all animals had received chronic Pra treatment. Therefore, sham-operated animals treated



**Figure 3. Serum metabolic profile of 6-OHDA rats evolves with PD progression.** (A) Example of <sup>1</sup>H NMR spectrum at 950 MHz ( $\delta$ 6.5–4.7 ppm and  $\delta$ 6–8.5 ppm) using CPMG pulse sequence. Assignment was as follows: 1, isoleucine; 2, leucine; 3, valine; 4, BHB; 5, lactate; 6, alanine; 7, arginine; 8, lysine; 9, acetate; 10, glutamine; 11, methionine; 12, acetone; 13, acetoacetate; 14, glutamate; 15, pyruvate; 16, citrate; 17, asparagine; 18, creatine; 19, phospho-creatine; 20, DMSO2; 21, choline; 22, PC; 23, glucose; 24, betaine; 25, myoinositol; 26, glycine; 27, glycerol; 28, threonine; 29, glycerophosphocholine; 30, serine; 31, ascorbate; 32, glycerate; 33, proline; 34, deoxycytidine triphosphate; 35, tyrosine; 36, histidine; 37-phenylalanine; 38, formate. Macromolecules are not specified (see Supplemental Table 2). (B and C) OPLS model built with <sup>1</sup>H NMR spectra of serum samples from 6-OHDA ( $n = 29$ ) and sham-operated ( $n = 22$ ) rats and their PDP scores: the 6-OHDA serum OPLS model.  $R^2Y = 0.926$ ;  $Q^2 = 0.604$ ; 1 predictive and 3 orthogonal components; CV-ANOVA,  $P = 3.47 \times 10^{-7}$ . (B) Score plot versus the first predictive and first orthogonal components. A clear gradation of color is observed from left to right, showing that metabolic profiles evolve with PD progression. (C) Loadings plotted in 1D with NMR variables color coded for their correlation with PDP score from green (low correlation) to red (high correlation). Positive peaks indicate upregulated metabolites along with increasing PDP score, while negative peaks indicate downregulated metabolites along with PDP score evolution. (D) Relative amplitude of the metabolites most involved in metabolic gradation in 6-OHDA animals, i.e., alanine, betaine, BHB, DMSO2, glycine, lactate, pyruvate, serine, threonine, and valine in sham-operated ( $n = 22$ ), prodromal-like ( $n = 14$ ), and clinical-like ( $n = 15$ ) animals. Data are represented as mean  $\pm$  SEM, 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test and correction for multiple comparisons. \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ .

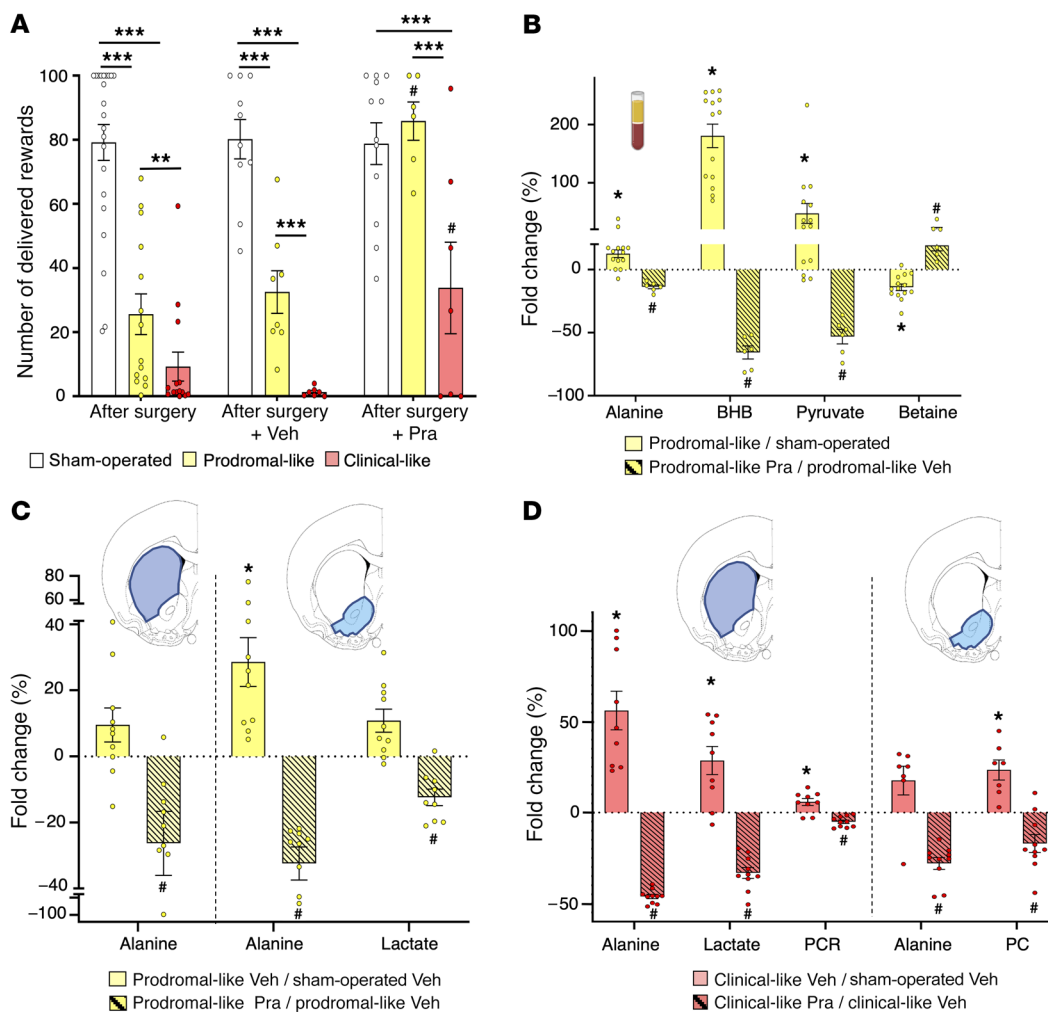




**Figure 4. Brain metabolic profile of 6-OHDA rats is gradually modified during PD progression, consistently with serum results.** (A) Example of  $^1\text{H}$  HRMAS NMR spectra of 6-OHDA rat brain (DS) at 500 MHz. Assignment was as follows: 1, lactate; 2, alanine; 3, GABA; 4, Acetate; 5, N, acetylaspartate; 6, glutamate; 7, glutamine; 8, aspartate; 9, glutathione; 10, phosphocreatine and creatine; 11, choline; 12, phosphoethanolamine; 13, PC; 14, glycerophosphocholine; 15, myoinositol; 16, taurine; 17, scyllo-inositol; 18, glycine; 19, ascorbate. (B) Score plot of the OPLS model built with  $^1\text{H}$  HRMAS NMR spectra of DS versus the first predictive and the first orthogonal components (6-OHDA DS OPLS model). There is clear color gradation from left to right, showing that metabolic profiles evolve with PD progression.  $R^2Y = 0.883$ ;  $Q^2 = 0.703$ , 1 predictive and 3 orthogonal components, CV ANOVA  $P = 0.0003$ . (C) Relative amplitude of metabolites in DS in sham-operated ( $n = 15$ ), prodromal-like ( $n = 10$ ), and clinical-like ( $n = 9$ ) 6-OHDA animals for the 5 key metabolites implicated in metabolic gradation observed in the OPLS, i.e., alanine, glutamate, lactate, phosphocreatine, creatine (PCR), and taurine. (D) Score plot of the OPLS models built with  $^1\text{H}$  HRMAS NMR spectra, of Nacc versus the first predictive and first orthogonal components (6-OHDA Nacc OPLS model). Color gradation from left to right shows the evolution of metabolic profiles with PD progression.  $R^2Y = 0.690$ ;  $Q^2 = 0.523$ , 1 predictive and 1 orthogonal component, CV ANOVA,  $P = 0.0005$ . (E) Relative amplitude of metabolites in Nacc in sham-operated ( $n = 14$ ), prodromal-like ( $n = 10$ ), and clinical-like ( $n = 7$ ) 6-OHDA animals for the 4 key metabolites implicated in metabolic gradation observed in the OPLS, i.e., alanine, choline, lactate, and PC. Data are represented as mean  $\pm$  SEM, 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test and correction for multiple comparisons.  $*P \leq 0.05$ .

with Veh were used to normalize the metabolite levels. As in serum, Pra administration caused a decrease of some metabolites previously increased by 6-OHDA lesions. In prodromal-like animals, this was observed for alanine in DS and Nacc and for lactate in Nacc (Figure

5C). In the clinical-like group, the alanine levels after Pra evolved similarly to those of prodromal-like animals, and lactate was significantly modified in DS. Furthermore, we observed a reversion of PCR and PC levels in DS and Nacc respectively (Figure 5D).



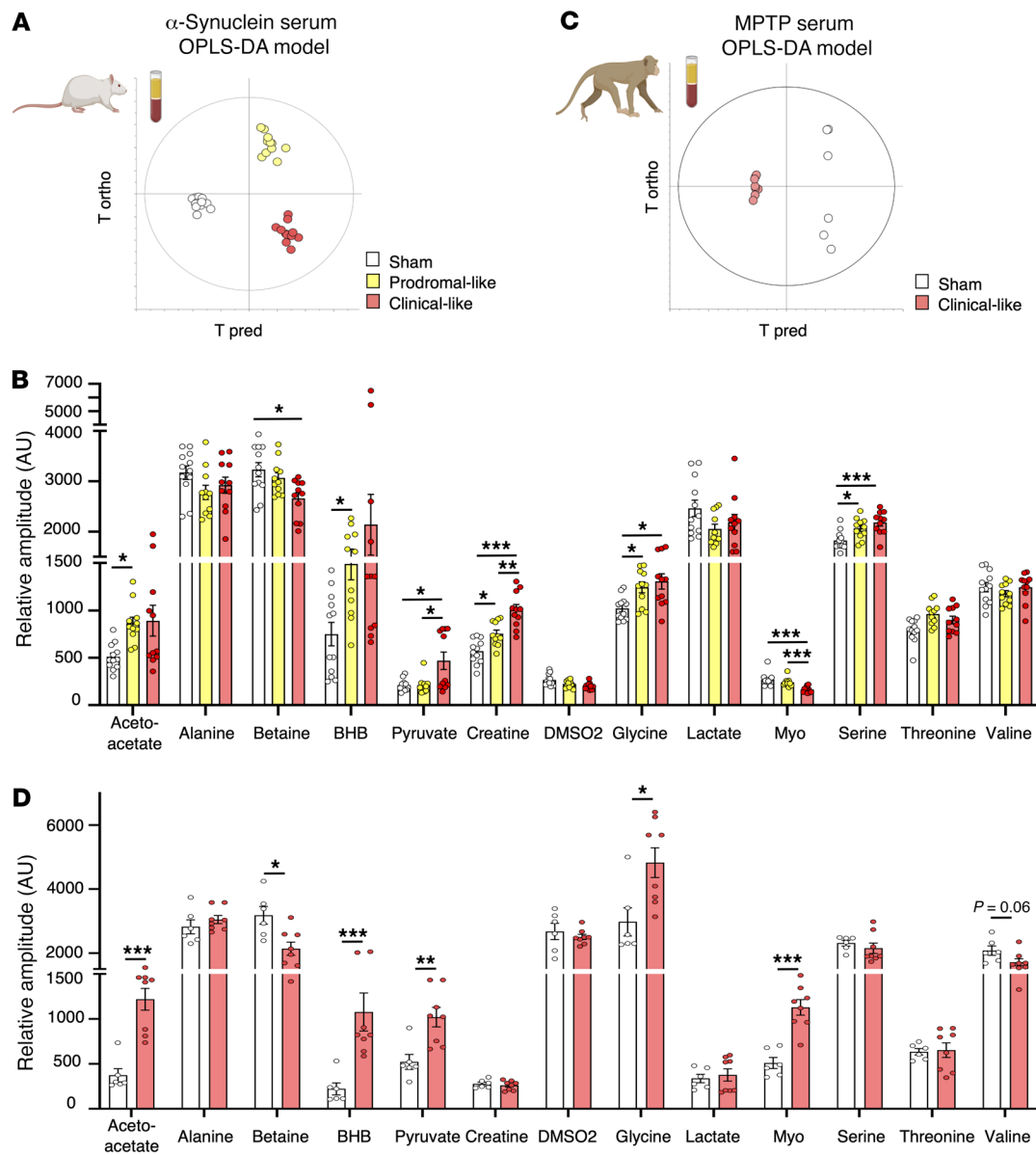
**Figure 5. Impact of chronic treatment with a dopaminergic agonist (Pra) on behavioral and metabolic dysregulations of 6-OHDA rats.** (A) Self-administration performances. Mean number of sucrose deliveries per session after surgery or after chronic administration of Veh or Pra (last 3 days). Pra treatment ( $n = 6$ ) induced a total reversion of the lesion effect on the number of sucrose deliveries in prodromal-like compared with Veh ( $n = 8$ ). In clinical-like animals, Pra treatment ( $n = 7$ ) induced a moderate increase in the number of sucrose deliveries compared with Veh ( $n = 7$ ) without reaching the performance of sham-operated animals ( $n = 12$ ). (B) Serum metabolic dysregulations. Percentage of variation of serum metabolites between control and prodromal-like animals ( $n = 14$ ; open bar) and between prodromal-like animals treated with Veh or Pra ( $n = 6$ ; hatched bar). Alanine, betaine, BHB, and pyruvate vary in the opposite direction compared with the lesion effect. (C and D) Brain metabolic dysregulations. Percentage of variation of brain tissue metabolites normalized to sham-operated animals treated with Veh in DS and in Nacc. Note in prodromal-like (C) and clinical-like animals (D), respectively, the reversion of metabolic dysregulation induced by Pra ( $n = 9$  for DS and  $n = 10$  for Nacc for both groups; hatched bar) compared with Veh ( $n = 10$  for each structure in prodromal-like animal;  $n = 9$  for DS and  $n = 7$  for Nacc in clinical-like animal; filled bar). Data are represented as mean  $\pm$  SEM, 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; # $P \leq 0.05$ , prodromal-like or clinical-like Pra compared with prodromal-like or clinical-like Veh.

Overall, the 6-OHDA rat model showed substantial alterations in both the serum and tissue metabolomes, associated with the progression of the disease and already detectable in the prodromal-like stage. Moreover, some of these alterations were partially reversed by chronic administration of Pra, which also reversed neuropsychiatric deficits. In order to assess the specificity of the biomarkers found in the 6-OHDA model regarding progression and pathophysiological mechanisms of the disease, we extended the serum metabolomics study to 2 other PD animal models.

**6-OHDA rats,  $\alpha$ -synuclein rats, and MPTP monkeys share common serum metabolic perturbations.** First, using the same rat strain (Sprague-Dawley) as in the 6-OHDA study, we selected an  $\alpha$ -synuclein rat model in which the overexpression of human A53T

$\alpha$ -synuclein was induced in the SNc using adeno-associated viral vectors (AAV). This expression leads to progressive neurodegeneration in the targeted region, allowing follow-up of the different stages of PD in the same animal (20), namely, a prodromal-like stage approximately 3 weeks after injection and a clinical-like stage after approximately 10 weeks, characterized by degeneration of the nigrostriatal pathway accompanied by motor dysfunctions reminiscent of the impairments observed in the clinical phase of PD (Supplemental Figure 2).

OPLS-DA analysis was used to evaluate whether a specific metabolic signature was associated with each disease stage (i.e., the  $\alpha$ -synuclein serum OPLS-DA model). Sham-operated animals (i.e., infected with GFP) exhibited no difference among the 3 time



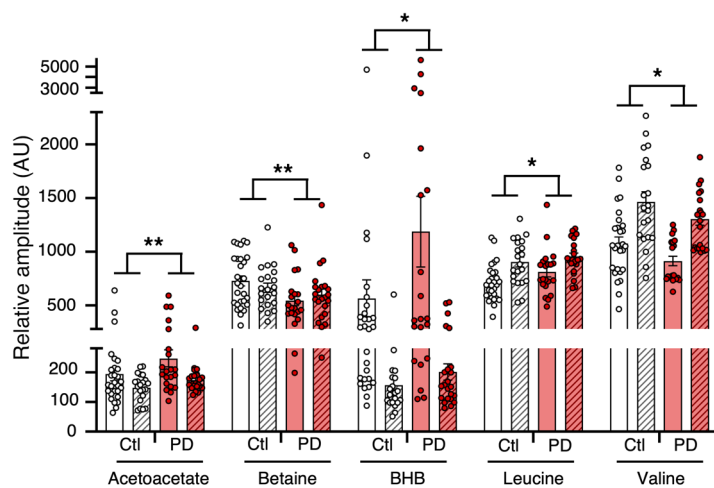
**Figure 6. Alternative PD models from different animal species show similar metabolic dysregulations in serum.** (A) Score plot of the OPLS-DA model built with <sup>1</sup>HNMR spectra of serum samples from  $\alpha$ -synuclein rats versus first predictive and first orthogonal components ( $\alpha$ -synuclein OPLS model). Three groups are clearly discriminated, mimicking 3 different stages of PD (sham operated,  $n = 12$ ; prodromal-like,  $n = 11$ ; clinical-like,  $n = 11$ ).  $R^2Y = 0.929$ ;  $Q^2 = 0.518$ ; 1 predictive and 3 orthogonal components; CV ANOVA,  $P = 0.008$ . (B) Relative amplitude of most discriminating metabolites in the  $\alpha$ -synuclein OPLS model, i.e., acetoacetate, betaine, BHB, creatine, glycine, myo-inositol (myo), pyruvate, and serine in sham-operated ( $n = 12$ ), prodromal-like ( $n = 11$ ), and clinical-like ( $n = 11$ ) animals. (C) Score plot of the OPLS-DA model built with <sup>1</sup>HNMR spectra of serum samples from nonhuman MPTP primates versus first predictive and first orthogonal components (MPTP OPLS-DA model). Sham-operated ( $n = 6$ ) and clinical-like ( $n = 8$ ) animals are clearly discriminated.  $R^2Y = 0.998$ ;  $Q^2 = 0.963$ ; 1 predictive and 1 orthogonal component; CV ANOVA  $P = 0.0005$ . (D) Relative amplitude of most discriminating metabolites in the MPTP OPLS-DA model, i.e., acetoacetate, alanine, betaine, BHB, creatine, lactate, pyruvate, and valine in sham-operated ( $n = 6$ ) and MPTP ( $n = 8$ ) animals. Data are represented as mean  $\pm$  SEM, mixed model followed by Tukey's post hoc test or Mann-Whitney test. \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ .

points, 0, 3, and 10 weeks after injection (Supplemental Figure 3), while for  $\alpha$ -synuclein animals, the 3 time points were clearly separated (Figure 6A), indicating that each stage was characterized by a specific metabolic signature. In particular, an increase of BHB, glycine, pyruvate, and serine and a decrease of betaine were observed over time, as in 6-OHDA rats. Moreover, in the  $\alpha$ -synuclein rat model only, myo-inositol decreased, while acetoacetate and creatine increased (Figure 6B).

These results revealed similarities in metabolic disturbances for 2 different PD rat models that were associated with disease progression. To further investigate, we performed metabolic analysis in a nonhuman primate PD model, the MPTP model, which mimics the clinical stage of PD and presents a greater homology with humans (26).

The OPLS-DA model presented in Figure 6C (i.e., the MPTP serum OPLS-DA model) showed clear discrimination between





**Figure 7. Main metabolic changes between PD patients and controls in NIH and Italian cohorts.** For each cohort, a *t* test was performed to find significant differences between PD patients ( $n = 19$  for NIH and  $n = 23$  for first Italian cohorts) and healthy control subjects ( $n = 30$  for NIH and  $n = 21$  first Italian cohorts), while 2-way ANOVA followed by Šidák's post hoc test was performed on both cohorts grouped to highlight pathology effects.  $*P \leq 0.05$ ;  $**P \leq 0.01$ .

sham-operated and MPTP groups. On the one hand, nonhuman MPTP primates presented a significant increase of lactate and a decrease of valine, as in 6-OHDA rats. On the other hand, acetoacetate and creatine significantly increased, as in the  $\alpha$ -synuclein rats. Finally, we observed an increase of BHB and pyruvate and a decrease of betaine, as in both rodent models (Figure 6D). Taken together, these results reveal common metabolic alterations associated with PD progression in 3 different animal models performed in 2 different species. To further validate the clinical relevance of these markers, we compared these preclinical results to those obtained in PD patient samples.

*Serum metabolic signatures of de novo PD patients and PD animal models have similarities.* Each cohort was first analyzed individually, i.e., each de novo PD patient group ( $n = 19/21$  NIH/Italy) was compared with an age- and sex-matched control group ( $n = 30/23$  NIH/Italy). Except for some metabolites, such as alanine (data not shown), the observed variations were consistent between the 2 cohorts, as shown in Figure 7. For instance, we observed a marginal increase of BHB and acetoacetate in Italian PD patients (+28.3%,  $P = 0.24$  and +17.2%,  $P = 0.05$ , respectively), which was even higher in NIH PD patients (+103.2%,  $P = 0.09$  and +28.1%,  $P = 0.12$ ).

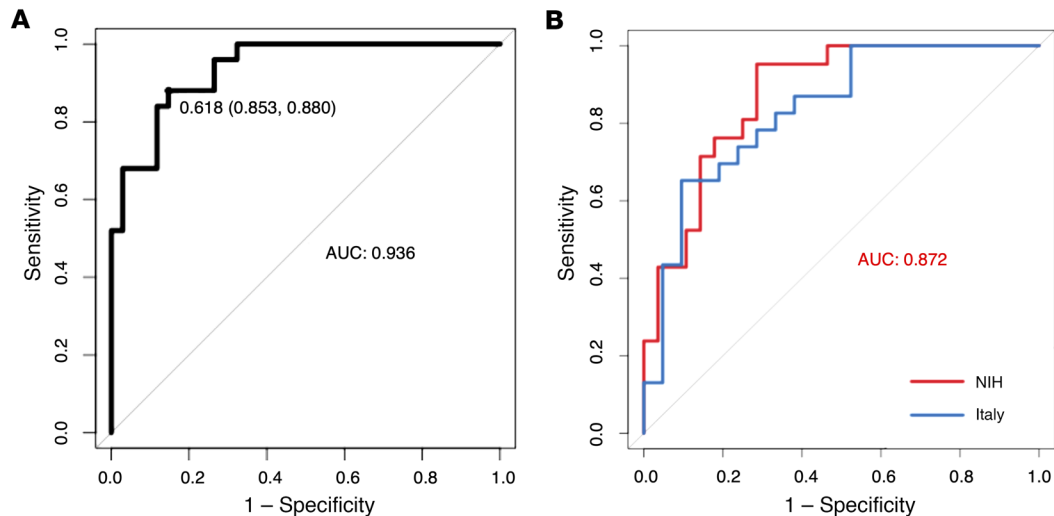
To increase statistical power, the 2 cohorts were pooled ( $n = 42$  PD,  $n = 53$  control). Nevertheless, as the data variance was mostly affected by sample origin, i.e., Italian or NIH, independently of the case (PD or control), we performed a 2-way ANOVA with (a) the origin of the cohort and (b) the case (control or PD) as factors to extract PD information only. Figure 7 presents the metabolites significant for the case factor only, without interaction between the cohort origin and the case. The increase of BHB and acetoacetate observed in each cohort became significant when pooled. Betaine was significantly decreased in the serum of PD patients, as in the  $\alpha$ -synuclein and MPTP models. Moreover, valine significantly decreased, as observed in the 6-OHDA rat model. Finally, a trend toward a decrease of leucine was noted. Moreover, the analysis of a subset of serum samples from other de novo PD patients treated with 0.5 to 4.5 mg/d Pra ( $n = 9$ ) revealed a tendency toward normalization of BHB and betaine levels compared with those of nontreated PD patients, as observed in 6-OHDA rats (Supplemental Figure 4).

*Serum metabolites as putative composite biomarker for early diagnosis of PD.* We next assessed the diagnostic value of the metab-

olites found to discriminate prodromal-like animals from sham operated or de novo PD patients from controls. We developed multiple logistic regression models based on the metabolites that were statistically significant in the above comparisons and in at least 3 of the 4 PD models studied (6-OHDA,  $\alpha$ -synuclein, MPTP, and human), i.e., acetoacetate, betaine, creatine, BHB, pyruvate, and valine. We tested each metabolite individually and all possible combinations thereof and pooled prodromal-like animals from the 6-OHDA and  $\alpha$ -synuclein models.

The best regression model, as evaluated by the receiver operating characteristic (ROC) curves, retained all 6 metabolites, using a regression based on the following predictive algorithm: ( $P = 1.107 \times 10^{-15}$ ):  $\text{logit}(P) = \log(P/(1 - P)) = -54.72 + 0.49 \text{ BHB} + 0.39 \text{ pyruvate} - 0.42 \text{ valine} + 0.06 \text{ acetoacetate} + 0.52 \text{ creatine} - 0.10 \text{ betaine}$ . The ROC curve had an AUC of 0.936. By applying the optimal threshold of 0.618 (sensitivity, 0.853, specificity, 0.880; Figure 8A), we found an accuracy of 92.5%, indicating that 37 of the 40 animals included in the validation cohort (clinical-like rats and all primates) were correctly predicted regarding what group they belonged to.

Concerning human samples, we used the NIH cohort to train the model since (a) this was the largest cohort and (b) it included only recently diagnosed patients (de novo patients diagnosed  $\leq 1$  year) in contrast with the Italian cohort, which included patients with PD duration of 3 years or less, defined from symptom onset to diagnosis. Again, as with animal data, the best regression model retained all 6 metabolites and was based on the following predictive algorithm: ( $P = 1.95 \times 10^{-4}$ ):  $\text{logit}(P) = \log(P/(1 - P)) = -42.78 + 0.16 \text{ BHB} - 3.31 \text{ pyruvate} - 12.01 \text{ valine} + 7.06 \text{ acetoacetate} + 3.14 \text{ creatine} - 7.79 \text{ betaine}$ . The subsequent ROC curve had an AUC of 0.87. The optimum threshold was 0.279, and corresponding sensitivity and specificity were, respectively, 0.952 and 0.714 (Figure 8B). Using this classifier, the subjects of the Italian cohort were predicted to have PD with 82.6% accuracy, with 17.4% false negatives. Consistently, the ROC curve built with the same classifier and Italian cohort had an AUC of 0.83 (See Figure 8B). To perform a first prospective-like validation, samples from a second set of de novo PD patients from Italy ( $n = 36$ ), obtained after all the above-described analyses, were submitted to the same NMR-based metabolomics workflow, and 84.6% of them were classified as PD.



**Figure 8. Logistic regression provided a serum biomarker composed of 6 metabolites: BHB, acetoacetate, valine, creatine, betaine, and pyruvate. (A)** ROC curve with serum samples of prodromal-like ( $n = 25$ ) and sham-operated ( $n = 34$ ) animal models (6-OHDA and  $\alpha$ -synuclein rats) (AUC = 0.936; sensitivity: 0.853; specificity: 0.88). **(B)** ROC curve with data of PD patients and matched controls of NIH cohort in red ( $n = 19$  and  $n = 30$ ; AUC = 0.88; sensitivity: 0.957; specificity: 0.714) and first Italian cohort in blue ( $n = 23$  and  $n = 21$ ; AUC = 0.83; sensitivity: 0.65, specificity: 0.90).

Finally, a multiple logistic regression was performed using serum data from all PD animals (prodromal-like and clinical-like) from all models using the same 6 metabolites and was evaluated with the subsequent ROC curve presenting an AUC of 0.954 (Supplemental Figure 5) and an accuracy of 88.9%. Altogether, the accuracy of the composite biomarker developed from the same 6 serum metabolites was at least 82.6% whatever the species.

## Discussion

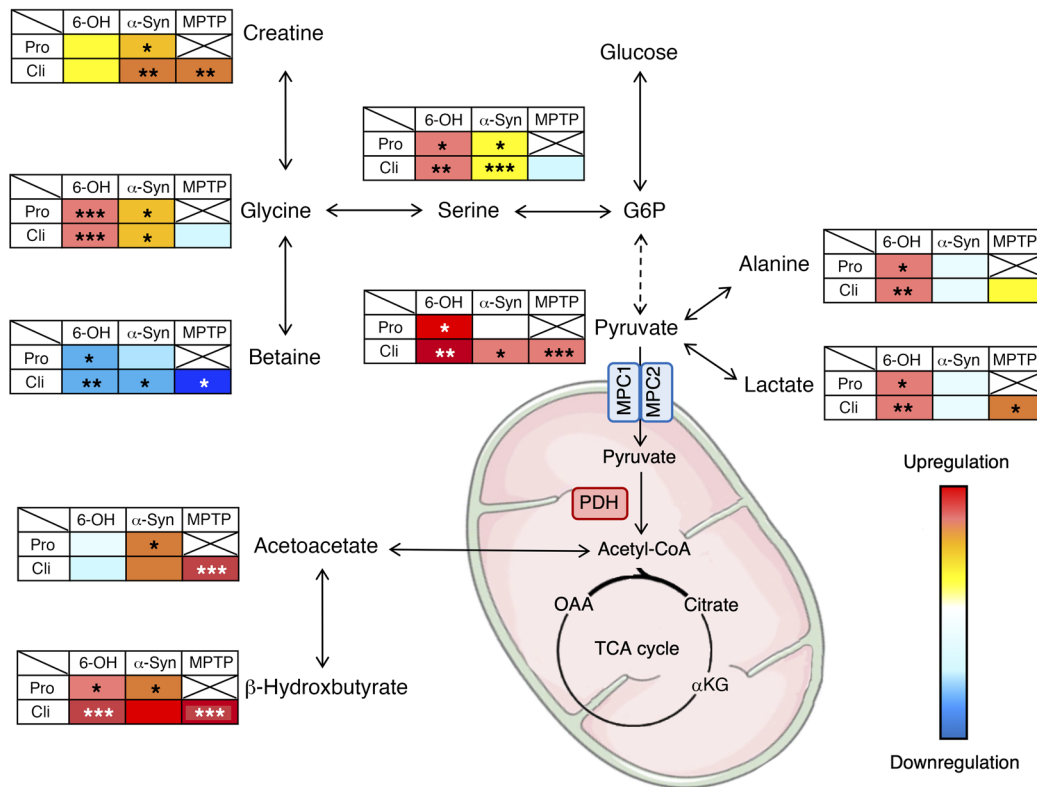
Late and inaccurate diagnosis of PD (3, 27) occurs if patient management and therapies are too restricted. Therapies remain only symptomatic and become ineffective after several years. Although many molecules have been tested, there are still no agents or neuroprotective therapies to efficiently slow down, stop, or reverse neurodegeneration in PD patients, despite promising theoretical or preclinical evidence, partly because treatment is applied too late (28–30). Thus, finding easily measurable and highly predictive biomarkers of the prodromal phase of the disease appears as a milestone for the acceleration of curative therapeutic development and improvement of patient care.

In the present study, using NMR-based metabolomic approaches, we observed alterations of the metabolome in serum and tissue of different animal models mimicking the different stages of PD, including the prodromal phase. NMR provides highly reproducible results and requires minimal sample preparation, which is compatible with multicentric studies and clinical routines. Concerning tissue samples, despite the absence of some metabolites, such as pyruvate and citrate, mainly due to postmortem effects (31), we were able to confirm dysregulation observed in serum, demonstrating that blood could reflect central dysfunction (32), at least partially. In addition, the present multimodel approach overcame the intrinsic limitations of each animal model and increased the incomplete predictive value of each model alone, revealing a characteristic set of dysregulated metabolites as a potential biomarker. Finally, we extended the study to human

serum samples from 2 biobanks to validate the clinical relevance of our biomarker of PD.

We have demonstrated that the profiles of 6 metabolites, acetoacetate, betaine, BHB, creatine, pyruvate, and valine, combined together, could constitute an accurate PD composite biomarker for animal models and for human samples. The use of this biomarker allowed us to discriminate NIH de novo PD patients from healthy controls (AUC = 0.88) and Italian de novo PD patients from healthy controls (first cohort), though to a slightly lesser degree (AUC = 0.83). The divergent preanalytical procedure applied for serum sampling in the 2 cohorts, (i.e., tubes used, sample processing, etc.), may represent a major source of experimental variability that could explain this difference (33, 34). Moreover, it should be noted that the human samples were collected under a standardized experimental protocol that was very strict, but not metabolomics designed. This reflects the power of metabolomics and the robustness of our results and supports the view that serum biomarkers, easier to use and less invasive than imaging methods, present a similar efficiency (35). Moreover, in an analysis one year later, 84.6% of the additional de novo PD patients (second Italian cohort) were classified as having PD, which clearly demonstrates the robustness of NMR-based metabolomics and provides an initial prospective-like validation of the composite biomarker.

Interestingly, the dysregulation of 3 of the 6 metabolites composing the biomarker, i.e., betaine, BHB, and pyruvate, was partially corrected by chronic treatment with Pra in prodromal-like 6-OHDA rats as well as their motivational deficits. This partial pharmacological reversion was also observed in a subset of de novo patients for betaine and BHB. Pra, classically used in PD patients to improve symptoms and as a dopaminergic agonist, could result in changes in dopaminergic transmission, the alteration of which represents a major hallmark of PD pathophysiology. Therefore, this partial pharmacological reversion observed both in animals and in de novo patients reinforces the specificity of our biomarker regarding changes in dopaminergic



**Figure 9. Schematic representation of altered metabolic pathways in different PD animal models mimicking different stages of the disease, suggesting possible reprogramming of pyruvate metabolic pathway.** Degrees of dysregulation were represented by color gradation compared with sham-operated animals in each model. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001. Pro, prodromal-like; Cli, clinical-like; G6P, glucose-6-phosphate; OAA, oxaloacetate; αKG: α-ketoglutarate; α-syn, α-synuclein.

gic transmission, which is relevant to PD pathophysiology and demonstrates the power of metabolomics for identifying robust biomarkers, potentially monitoring therapeutic outcomes, in a less invasive and more convenient way than the current methods, such as the DaTscan (36).

The metabolic dysregulations reported in the present study could provide some clues to the mechanisms impacted during PD progression. In the 6-OHDA model, the gradation of metabolic profiles was clearly associated with the evolution of the PDP score even from very early on. In particular, glycolytic (e.g., pyruvate) and associated metabolites (e.g., lactate) were increased. Interestingly, these increases were also observed in the α-synuclein and primate models, except for lactate in α-synuclein rats (Figure 9). Importantly, lactate increase was also observed in DS and Nacc and may reflect upregulation of the activity of the astrocyte-neuron lactate shuttle (37, 38), known to play a major role in central nervous system homeostasis and energy metabolism (39, 40), especially in energy production. It is noteworthy that alanine, intrinsically linked to this shuttle (40), was also increased in sera and tissues of 6-OHDA animals.

Serine and glycine, possibly deriving from the first steps of glycolysis (41), were increased in the 2 rat models studied. They have been described as influencing mitochondrial dynamics and homeostasis (42) and are, furthermore, coagonists of NMDA receptors (43). Their increase may support glutamatergic hyperactivity, often fundamental to neurodegeneration (44, 45). Beta-

ine and creatine, which can derive from glycine (46, 47), were also dysregulated, but in opposite ways, i.e., betaine was decreased in all animal models, whereas creatine was increased in α-synuclein and primate models. Both may attenuate and protect against oxidative stress (48–51) that represents the primary cause of neuronal death in PD. In the literature, previous metabolomics studies have reported modifications of glycolysis in brain and blood samples of PD animal models (52–54). Dysregulated glycolysis has also been described in animal models expressing neuropsychiatric symptoms similar to those found in the early stages of PD, such as depression or anxiety (55, 56). Together, these observations place glycolysis as a central actor (56, 57) of dysregulations occurring during PD processes and possibly at the first stages of the disease. Surprisingly, in our study, the increase of these glycolytic or glycolytic-linked metabolites (pyruvate, alanine, lactate, glycine, serine) was not associated with a rise in citrate, the first metabolite of the Krebs cycle, also known as tricarboxylic acid (TCA) (other metabolites of the TCA cycle were not observable with the method used). These observations could suggest decoupling of glycolysis from the TCA cycle, leading to an accumulation of glycolytic metabolites. This is in agreement with the increase of ketone bodies (BHB, acetoacetate) in all animal models, which could be used as an alternative fuel to maintain TCA-cycle functioning (Figure 9). Ketone bodies could increase mitochondrial ATP production and support antioxidant defenses (58). Of note, MPTP and 6-OHDA used in animal models are known to exert

their cytotoxic activities by depleting mitochondrial ATP in the brain (59). As such, an increase in ATP production in PD mice could protect them from developing motor symptoms (60). Previous studies describing an increase of ketone bodies in blood of PD patients (61) have suggested their possible neuroprotective impact (58, 62, 63). Interestingly, high levels of ketone bodies have been associated with an inhibition of the pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) (64), an enzymatic complex located in mitochondria and responsible for the transformation of pyruvate to acetyl-CoA, a crucial step between glycolysis and the TCA cycle. Such inhibition could explain the accumulation of pyruvate and associated metabolites observed in the present study in animal models (65, 66). In human blood, however, a nonsignificant decrease of pyruvate levels was observed, which could account for the negative coefficient found in the regression for pyruvate. This discrepancy between animal models and humans may have different origins, either experimental or metabolic. For instance, metabolic alterations in the blood could only partially reflect, and with some differences between animal models and humans, the metabolic alterations occurring in the brain regions affected in PD. Further investigations on brain tissues will be of great interest to determine exactly how pyruvate metabolism may be implicated in the pathophysiology of PD. However, the downregulation of PDHC gene expression observed in plasma of PD patients (67) as well as a decrease in PDH level in the putamen and SNc (68) are consistent with pyruvate level alteration and with our work. In addition, it has been shown that the mitochondrial pyruvate carrier, which acts an integral part of the shift from glycolysis to the TCA cycle by allowing the transport of pyruvate into the mitochondria, could play an important role in neuronal death and thus represents a possible target for attenuating neurodegeneration (69–71). These 2 intermediaries between glycolysis and the TCA cycle may represent central players in the pathophysiological mechanisms underlying PD and need further investigation.

In summary, our study reports common serum metabolic alterations in 3 animal models mimicking PD, despite coming from different cohorts and species, as early as the prodromal-like phase. Consequently, this common signature is likely to reflect specific alterations linked to PD pathophysiology. This provides some clues about the mechanisms involved during PD progression, which now need to be more deeply investigated. In particular, preclinical models displaying a slowly progressive pathology, such as the intrastriatal injection of preformed fibrils of  $\alpha$ -synuclein (72) could be useful for further studying the progression of metabolic alterations upon initiation of  $\alpha$ -synuclein seeding and for identifying underlying mechanisms. Besides providing clues for deeper investigation of metabolic alterations in animal models, we also found metabolic dysregulations in sera of de novo PD patients (i.e., clinical phase) coming from 2 biobanks not specifically designed for metabolomics. Logistic regression, using the same metabolites as those used for animals, enabled very adequate discrimination between control and PD patients in those 2 cohorts from different geographic origins. A more extended study is now necessary, in particular with prodromal patients.

Furthermore, although our study was performed in PD animal models and PD patients, strongly supporting the specificity of our

biomarker for this pathology compared with healthy subjects, we cannot completely exclude that the biomarker may reflect metabolic dysfunctions commonly encountered in neurodegenerative diseases or even more in neurodegenerative disorders with parkinsonian symptoms, such as multiple system atrophy or progressive supranuclear palsy, sometimes mistaken for PD. Thus, with the perspective of clinical application, it would appear necessary to test the ability of our biomarker to discriminate these disorders from PD and thus demonstrate its specificity and potential for the differential diagnosis of parkinsonian syndromes.

Finally, the variations observed in the 3 animal models suggest possible modification in energy metabolism, especially from glycolysis to the TCA cycle. Even if this hypothesis needs additional evidence, we suggest that this alteration may be a crucial point that could be targeted to developing curative PD care.

Our multimodel and translational study demonstrates the usefulness and reproducibility of untargeted metabolomics as a noninvasive approach to searching for biomarkers of PD in animal models. The approach seems particularly promising for use in PD patients, as serum is easily accessible and the biomarker may be relevant even at early stages of the disease when other methods fail.

## Methods

See Supplemental Methods for details regarding surgery, behavioral test, immunochemistry processing and quantification, and NMR experiments.

### Flow chart

Figure 1 illustrates a flow chart of the whole protocol for the animal models. The rats of the first cohort (Figure 1A) were trained for 2 weeks for self-administration until they reached stable performances and were submitted to a stepping test before receiving bilateral intracerebral injection of 6-OHDA ( $n = 29$ ) or NaCl ( $n = 22$ ) in the SNc. After recovery and stabilization of the lesion (around 3 weeks), self-administration was resumed for 1 week, and the stepping test was repeated to monitor the evolution of performances before submitting each group (6-OHDA and NaCl) to 2 weeks of daily injections of 0.2 mg/kg Pra (6-OHDA Pra,  $n = 15$ ; NaCl Pra,  $n = 11$ ) or 0.09% NaCl (6-OHDA NaCl,  $n = 14$ ; NaCl NaCl,  $n = 11$ ). Self-administration was continued throughout Pra treatment, and the stepping test was performed for the last time at the end. Serum samples were collected after surgery, after stabilization of self-administration performances, and at the end of Pra treatment. Brains were collected at the end of the behavioral procedure, snap-frozen in liquid nitrogen, and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  before being processed for histology and  $^1\text{H}$  HRMAS NMR experiments. The second cohort of rats (Figure 1B) received intracerebral infusion of AAV-hA53T $\alpha$ -synuclein ( $n = 12$ ) or AAV-GFP ( $n = 12$ ) in the SNc. Serum samples were taken longitudinally during the study, before and 3 and 10 weeks after AAV infusion.

Monkeys ( $n = 8$ ) received intramuscular MPTP injections (0.3–0.5 mg/kg) every 4 to 5 days over 3 weeks (73). Repeated administration of low MPTP doses was used to mimic a moderate stage, with slow development of the disease and triggering of a moderate dopaminergic lesion. Serum samples were collected at the start of the experiment and after the monkeys had reached a stable parkinsonian state (Figure 1C). All serum samples were analyzed by  $^1\text{H}$  NMR at 950 MHz, and brain samples were submitted to  $^1\text{H}$  HRMAS NMR at 500 MHz.



## Animals

**Rats.** Experiments were performed on adult male Sprague-Dawley rats (Janvier) weighing approximately 300 g (7 weeks old) at the beginning of the experiment. They were housed under standard laboratory and ethical conditions with reversed light-dark cycle (12 hour light/12-hour dark cycle, with lights on at 7 pm) and with food and water available ad libitum.

**Monkeys.** Experiments were performed on adult male *Macaca fascicularis* (Tamarinier Ltee, Mauritius Island) weighing between 5 and 8 kg, aged between 3 and 5 years, and housed under standard conditions (12-hour light/12-hour dark cycle; 23°C; 50% humidity).

## Surgery

**6-OHDA bilateral injection.** As previously described (19, 22), bilateral injections of 2.3  $\mu$ L 6-OHDA (3 mg/mL) or NaCl 0.9% (sham) were administered in the SNc (anteroposteriority [AP] = -5.4 mm/lateral [L] =  $\pm$ 1.8 mm/dorsoventral [V] = -8.1 mm).

**$\alpha$ -Synuclein bilateral injection.** As previously described (20), bilateral injections of AAV-hA53T $\alpha$ -synuclein (1  $\mu$ L  $-7.0 \times 10^{12}$  vg/mL) or AAV-GFP ( $7.0 \times 10^{12}$  vg/mL, sham-operated animals) were administered in the SNc (AP = -5.1 mm and -5.6 mm/L =  $\pm$ 2.2 mm/V = 8 mm from bregma).

## Behavioral assessment

**6-OHDA rats.** Rats were submitted to 2 behavioral tests 3 weeks after surgery when the 6-OHDA lesion was believed to be stabilized (74).

**Operant self-administration: motivational component.** Rats were trained to self-administer a 2.5% sucrose solution in operating chambers (Med Associates) containing an active, reinforced lever, for which a press resulted in the delivery of 0.2 ml of sucrose solution associated with a light stimulus, and an inactive lever, unreinforced, for which a press caused neither delivery of sucrose nor light stimulus.

**Stepping test: motor component.** Animals, restrained by the experimenter so that they had 2 hind paws on the ground, were moved over a length of 90 cm by a rectilinear and regular movement from left to right and inversely along a table with a smooth surface. The number of forelimb adjustments during displacement was counted (19).

**MPTP monkeys.** The severity of parkinsonian states was evaluated using a rating scale taking into account classical motor symptoms (bradykinesia, rigidity, tremor, freezing, posture, and arm posture), spontaneous activities (arm movements, spontaneous eye movements, and home cage activity), and other activities (vocalization, triggered eye movements, and feeding) (75).

## TH immunostaining and quantification of denervation

**Brain sampling.** Rats were sacrificed by decapitation 1 day after the last session of sucrose self-administration and 1 hour after the last Pra or placebo injection (i.e., 6 weeks after 6-OHDA infusion or saline). Brains were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. They were then processed at -20°C for both immunostaining and HRMAS NMR to further match metabolomics and immunostaining-based lesions. For HRMAS NMR, thick sections of DS and Nacc tissue were pooled into disposable inserts and kept at -80°C until NMR analysis.

For immunostaining, 14  $\mu$ m coronal sections of striatal levels of interest (19) were sampled and stored at -20°C. TH immunostaining and quantification of denervation were then carried out as previously described and as detailed in supporting information (20, 23). Human

$\alpha$ -synuclein expression levels were revealed in the striatum by immunohistochemistry (see Supplemental Methods for protocol details).

## PD progression score in 6-OHDA model

In order to assign each 6-OHDA rat to a group mimicking a disease stage, as in clinics, we developed a score, referred to as the PDP score, that combined 3 criteria: (a) evaluation of neuropsychiatric symptoms (i.e., apathetic-like behavior), (b) evaluation of motor symptoms (i.e., fine motor deficit), both used in clinics, and (c) level of dopaminergic denervation in DS, only available postmortem in patients. Each criterion was ranked from 0 to 4 in integer values, as illustrated in Figure 2A. They were summed to produce the individual PDP score, ranging therefore from 0 to 12.

For the evaluation of behavioral deficits in the self-administration and stepping tests (criteria 1 and 2, respectively), we compared the performances of each animal before and after surgery. A value of 0 for each of these 2 criteria corresponded to an absence of deficit or to a deficit lower than 30%, i.e., the normal daily variability in the tests used. The following subcategories were set as follows: 1 = small deficit (30%–50%); 2 = medium symptoms (50%–70%); 3 = strong symptoms (70%–90%); and 4 = large or total deficit (>90%). Considering that motor symptoms appear after 70% of striatal dopaminergic neuron loss in PD patients, the value for dopaminergic denervation in the DS (criterion 3) was used as the limit between the prodromal-like and the clinical-like stages.

Regarding the PDP score obtained by addition of the values of the 3 criteria, 6-OHDA rats were classified as follows: (a) asymptomatic with weak lesions but no behavioral symptom (1  $\leq$  PDP score  $\leq$  2), (b) prodromal-like, i.e., presenting only neuropsychiatric disorders and limited DS lesions (3  $\leq$  PDP score  $\leq$  7), and (c), clinical-like, i.e., presenting neuropsychiatric disorders, motor symptoms, and widespread DS lesions (8  $\leq$  PDP score  $\leq$  12). All sham-operated animals scored 0, in spite of daily variability, as for PD-like animals (see above). Considering the low number of asymptomatic animals and the fact that they do not present any clinical relevance, they were excluded from the study.

## Human cohorts

Blood samples were obtained from de novo PD patients and matched-control subjects from the Parkinson's Disease Biomarkers Program (PDBP) Consortium, supported by the NIND at the NIH and from Santa Lucia Foundation cohorts. Inclusion criteria for NIH patients included recent diagnosis (de novo diagnosed  $\leq$  1 year) of PD according to the criteria of the Movement Disorders Society (MDS) (2). For the Italian cohort, patients reporting symptoms for 3 years or less, according to MDS, were included (de novo patients  $\leq$  3 years). Thus, in all cohorts, patients had not received any antiparkinsonian treatment at the time of inclusion and sampling and presented no dementia or active psychiatric disorders nor any other medical conditions that could compromise the study. Inclusion criteria for controls were absence of neurological diseases, no family history of movement disorders, and no specific medical conditions.

The cohort from the NIH included 19 de novo PD patients without antiparkinsonian treatment, and 30 age- and sex-matched controls. The Santa Lucia cohort (first Italian cohort) included 21 de novo PD patients and 23 age- and sex-matched controls. A second set of 36 de novo PD patients from Santa Lucia was provided later to evaluate,

in a prospective-like approach, the robustness of our method. All clinical and demographic information collected is summarized in Supplemental Table 1 (NIH and first Italian cohorts) and in Supplemental Table 3 (second Italian cohort). Moreover, 9 additional PD patients treated with Pra were also submitted to NMR analysis, but not used for statistical modeling.

#### NMR experiments: <sup>1</sup>H HRMAS NMR of 6-OHDA rat brain samples

**Data acquisition.** All HRMAS NMR spectra were acquired, as previously described (76), using a Bruker Advance III spectrometer (IRMaGe, CEA) at 500 MHz. 1D spectra were acquired using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence on spinning samples at 4 KHz and at T = 4°C.

**Data processing.** Quantification was performed with jMRUI software based on a quantum estimation (QUEST) procedure (77). This procedure requires the use of a metabolite database and a complete assignment of spectra. Nineteen metabolites were assigned and quantified (see Figure 4A): acetate, alanine, ascorbate, choline,  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA), glutamate, glutamine, glycine, glycerophosphocholine, glutathione, lactate, myo-inositol, *N*-acetylaspartate, PC, PCR, phosphoethanolamine, scyllo-inositol, and taurine. The amplitude of metabolite calculated by QUEST was normalized to the total spectrum signal. CRLB was calculated for each metabolite as estimates of the SD of the fit.

#### <sup>1</sup>H NMR of serum

**Serum sampling.** For rats, blood was collected under gas anesthesia with isoflurane (2%) from the caudal vein after 2 hours of fasting and was stored in ice before being rapidly centrifuged at 1600g for 15 minutes at 4°C. The supernatant serum was removed and stored at -80°C until the day of NMR. The time before freezing never exceeded 30 minutes (78).

For monkeys, blood was collected under anaesthesia (0.05 mg/kg atropine i.m. followed by 15 mg/kg zoletil i.m.) from the saphenous vein after a 12-hour fast and submitted to the same protocol as rat blood. For humans, blood was collected preferably after 8 hours of fasting, or, if fasting was not feasible, after at least 8 hours on a low-fat diet, and stored at room temperature for 15 to 60 minutes before being centrifuged at between 1200g and 1500g at 4°C for 10 to 15 minutes. The supernatant serum was then removed and stored at -80°C. The day of NMR experiments, samples were slowly thawed on ice, then quickly centrifuged to eliminate possible cryoprecipitates. NMR tubes were filled with 60  $\mu$ L serum sample and 120  $\mu$ L PBS, 0.1 M in D<sub>2</sub>O (50% of D<sub>2</sub>O, pH = 7.4) and stored at 4°C until NMR acquisition.

**Data acquisition.** All animal and human serum samples were submitted to the same NMR protocol. <sup>1</sup>H NMR experiments were performed on a Bruker Advance III NMR spectrometer at 950 MHz (IBS) using a cryoprobe with a 3 mm tube holder. 1D spectra were systematically recorded using a CPMG pulse sequence.

**Data processing.** The free induction decays were Fourier transformed and manually phased with the Bruker software Topspin, version 3.6.2. Then, further preprocessing steps (baseline correction, alignment, bucketing) were performed using NMRProcFlow, version 1.2, online (<http://nmrprocflow.org>). The spectra were segmented in 0.001 ppm buckets between 0 and 10 ppm, with exclusion of residual water peak, macromolecule signals, and other regions corresponding to pollution (5.38–5.30 ppm; 5.0–4.7 ppm; 2.2–2.0 ppm; 1.4–1.25 ppm; 1.15–1 ppm; 0.9–0.5 ppm). Each bucket was normalized to the total sum of buckets.

#### Statistics

**Multivariate analysis.** Data from liquid or HRMAS NMR were imported into SIMCA, version 14, for multivariate statistics. An unsupervised principal components analysis (PCA) was first used for global visualization of the distribution of all samples, followed by an OPLS to find discriminatory metabolites associated with a specific stage of the disease. For the latter, either a continuous (i.e., PDP score) or a discrete variable (i.e., disease-stage groups) was used to label each sample, leading in the case of the discrete variable to OPLS-DA (discriminant analysis). Scores were plotted in 2D versus the 2 first components of the OPLS models while loadings were plotted in 1D to mimic an NMR spectrum, but with positive and negative peaks indicating respectively up- and downregulated metabolites. Furthermore, in this “statistical spectrum,” each NMR variable was color coded according to its correlation with group belonging. Metabolites with a correlation of 0.5 or more were considered the most discriminant and were submitted to further univariate analysis.

The metabolites showing significant modification in at least 3 of the 4 PD models studied were submitted to multiple logistic regression using R software (version 3.6.1, R core team). Logistic regression was presented using a generic equation of the following form:  $\log(P/[1 - P]) = \beta_0 + \beta_1 \times x$ , where  $x$  represents metabolite relative amplitude and  $\beta_0$  and  $\beta_1$  are the parameters associated with the intercept and the degree of change in metabolites, respectively. For animals, the regressions, including crossvalidation, were conducted with prodromal-like animals (6-OHDA and  $\alpha$ -synuclein prodromal-like rats) and corresponding sham-operated animals, while clinical-like animals were used for external validation (6-OHDA and  $\alpha$ -synuclein clinical-like rats, and all primates). The same type of analyses was conducted using the NIH cohort (de novo patients and corresponding controls). The Italian data were used for external validation. For both animals and humans, all combinations of the 6 selected metabolites were tested, and subsequent ROC curves were generated for each of them to assess the quality of the fit using AUC and optimal threshold, which maximizes sensitivity and specificity. The accuracy, i.e., number of correctly predicted (true positive and true negative) divided by total sample, was calculated.

**Univariate analysis.** All univariate analyses were performed using Graphpad Prism 8 software. All results were expressed as mean  $\pm$  SEM, with a threshold for significance fixed at 0.05.

**6-OHDA models.** For self-administration and stepping tests, Pra effect univariate analysis was performed by applying repeated measure (RM) 1-way ANOVA followed by Šidák's post hoc test. For histological and metabolomic data, 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test with correction for multiple comparisons was performed.

**$\alpha$ -Synuclein models.** For the longitudinal  $\alpha$ -synuclein study, some values were missing due to artifacts during NMR measurement. Data were therefore analyzed by fitting a mixed model proposed using a compound symmetry covariance matrix and were fitted using restricted maximum likelihood (REML). This model was followed by Tukey's post hoc test.

**MPTP monkeys.** Considering the low number of animals, the non-parametric Mann-Whitney test was used.

**Humans.** Data were log transformed given the non-Gaussian distribution of metabolite levels. First, 1-tailed  $t$  tests were performed individually in the 2 different cohorts. Then we applied 2-way ANOVA with (a) origin of the cohort and (ii) group (control or PD) as factors followed by post hoc Šidák's test.

### Study approval

Protocols complied with the European Union 2010 Animal Welfare Act, and the French directives were approved by the French national ethics committee (2013/113, no. 004) and by the local Grenoble and Lyon ethical committees (C2EA84 and CELYNE C2EA). For human samples, all donors gave written informed consent. For details concerning study approval in animals and humans, see Supplemental Methods.

### Author contributions

DM, TD, CC, SC, ELB, SB, and FF conducted research. DM, TD, CC, MD, and MBM conducted experiments. POF, VS, PB, and GS provided samples. DM, SB, and FF designed research. DM, SB, FF, and LV analyzed data. DM, SB, and FF wrote the manuscript.

### Acknowledgments

Samples from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) BioSEND, which receives government support under a cooperative agreement grant (U24 NS095871) awarded by the National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), were used in this study. We thank contributors who collected samples used in this study as well as patients and their families, whose help and participation made this work possible. Data and biospecimens used in the present study were obtained from the PDBP Consortium, supported by the NIND at the NIH. Investigators included Roger Albin, Roy Alcalay, Alberto Ascherio, Thomas Beach, Sarah Berman, Bradley Boeve, F. DuBois Bowman, Shu Chen, Alice Chen-Plotkin, William Dauer, Ted Dawson, Paula Desplats, Richard Dewey, Ray Dorsey, Jori Fleisher, Kirk Frey, Douglas Galasko, James Galvin, Dwight German, Lawrence Honig, Xuemei Huang, David Irwin, Kejal Kantarci, Anumantha

Kanthasamy, Daniel Kaufer, James Leverenz, Carol Lippa, Irene Litvan, Oscar Lopez, Jian Ma, Lara Mangravite, Karen Marder, Laurie Orzelius, Vladislav Petyuk, Judith Potashkin, Liana Rosenthal, Rachel Saunders-Pullman, Clemens Scherzer, Michael Schwarzschild, Tanya Simuni, Andrew Singleton, David Standaert, Debby Tsuang, David Vaillancourt, David Walt, Andrew West, Cyrus Zabetian, Jing Zhang, and Wenquan Zou. The PDBP investigators have not participated in reviewing the data analysis or content of the manuscript. The authors would like to thank Adrien Favier and Alicia Vallet from IBS (Grenoble) for technical assistance concerning NMR experiments and IR-RMN-THC Fr3050 CNRS for financial support for conducting the research. They also thank Pierre Alain Bayle from CEA (Grenoble) for his help concerning HRMAS experiments. Finally, we thank Jacques Brocard for his help and advice concerning univariate statistics and logistic regression methods as well as Fiona Hemming, Yvan Vachez, and Sara Meoni for English corrections and critical reading of the manuscript. This work was supported by the French National Research Agency (ANR), DOPALCOMP, Fondation de France (grant 00086205), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Grenoble Alpes University, and Association France Parkinson. IRMaGe is partly funded by the French program Investissement d'Avenir run by the ANR, grant Infrastructure d'avenir en Biologie Sante (ANR-11-INBS-0006). This project was partly funded by NeuroCoG IDEX UGA in the framework of the Investissements d'Avenir Program (ANR-15-IDEX-02).

Address correspondence to: Sabrina Boulet, Grenoble Institute of Neurosciences, 31 Chemin Fortuné Ferrini, 38700 La Tronche, Grenoble, France. Phone: 33.456520670; Email: sabrina.boulet@univ-grenoble-alpes.fr.

- Samii A, et al. Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;363:1783-1793.
- Postuma RB, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30(12):1591-1601.
- Hughes AJ, et al. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology*. 1992;42(6):1142-1146.
- Stocchi F. Therapy for Parkinson's disease: what is in the pipeline?. *Neurotherapeutics*. 2013;11:24-33.
- Adler CH, et al. Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: clinicopathologic study. *Neurology*. 2014;83(5):406-412.
- Dujardin K, Defebvre L. Apathy in Parkinson's disease: Clinical features, mechanisms and assessment. *Rev Neurol (Paris)*. 2012;168(8-9):598-604.
- Isella V, et al. Clinical, neuropsychological, and morphometric correlates of apathy in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2002;17(2):366-371.
- Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(4):368-376.
- Michell AW, et al. Biomarkers and Parkinson's disease. *Brain*. 2004;127(pt 8):1693-1705.
- Kaur R, et al. Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: pathophysiology to management. *Neurol Sci*. 2019;40(1):13-23.
- Johnson CH, Gonzalez FJ. Challenges and opportunities of metabolomics. *J Cell Physiol*. 2012;227(8):2975-2981.
- Ala-Korpela M. Potential role of body fluid 1H NMR metabolomics as a prognostic and diagnostic tool. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7(6):761-773.
- Hatano T, et al. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;87(3):295-301.
- Bogdanov M, et al. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. *Brain*. 2008;131(2):389-396.
- Quinones MP, Kaddurah-Daouk R. Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis*. 2009;35(2):165-176.
- Nagesh Babu G, et al. Serum metabolomics study in a group of Parkinson's disease patients from northern India. *Clinica Chimica Acta*. 2018;480:214-219.
- Lewitt PA, et al. Metabolomic biomarkers as strong correlates of Parkinson disease progression. *Neurology*. 2017;88(9):862-869.
- Magnard R, et al. What can rodent models tell us about apathy and associated neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease? *Transl Psychiatry*. 2016;6(3):e753.
- Drui G, et al. Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Mol Psychiatry*. 2014;19(3):358-367.
- Bourdenx M, et al. Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by  $\alpha$ -synuclein overexpression. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:46.
- Seo J, et al. A non-human primate model for stable chronic Parkinson's disease induced by MPTP administration based on individual behavioral quantification. *J Neurosci Methods*. 2019;311:277-287.
- Favier M, et al. Pramipexole reverses Parkinson's disease-related motivational deficits in rats. *Mov Disord*. 2014;29(7):912-920.
- Caudal D, et al. Depressive-like phenotype induced by AAV-mediated overexpression of human  $\alpha$ -synuclein in midbrain dopaminergic neurons. *Exp Neurol*. 2015;273:243-252.
- Goetz CG, et al. Movement Disorder Society-Sponsored Revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord*. 2008;23(15):2129-2170.
- Rokosik SL, Napier TC. Pramipexole-induced increased probabilistic discounting: comparison between a rodent model of parkinson's disease and controls. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(6):1397-1408.
- Porras G, et al. Modeling Parkinson's disease in primates: The MPTP model. *Cold Spring Harb*



- Perspect Med.* 2012;2(3):a009308.
27. Hughes AJ, et al. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology.* 1992;42(6):1142-1146.
  28. Salamon A, et al. Neuroprotection in Parkinson's disease: facts and hopes. *J Neural Transm (Vienna).* 2020;127(5):821-829.
  29. Olanow CW, et al. Why have we failed to achieve neuroprotection in Parkinson's disease? *Ann Neurol.* 2008;64(suppl 2):S101-S110.
  30. Beal MF, et al. Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53(suppl 3):S39-S47.
  31. Hampson RK, et al. The use of high-energy microwave irradiation to inactivate mitochondrial enzymes. *Anal Biochem.* 1982;123(1):49-54.
  32. Wong ML, Licinio J. Peripheral is central to the question. *Mol Psychiatry.* 2005;10(5):421-422.
  33. Teahan O, et al. Impact of analytical bias in metabolomic studies of human blood serum and plasma. *Anal Chem.* 2006;78(13):4307-4318.
  34. López-Bascón MA, et al. Influence of the collection tube on metabolomic changes in serum and plasma. *Talanta.* 2016;150:681-689.
  35. Pagano G, et al. Imaging in Parkinson's disease. *Clin Med (Lond).* 2016;16(4):371-375.
  36. Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(7):473-484.
  37. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(22):10625-10629.
  38. Lee Y, et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature.* 2012;487(7408):443-448.
  39. Mächler P, et al. In vivo evidence for a lactate gradient from astrocytes to neurons. *Cell Metab.* 2016;23(1):94-102.
  40. Waagepetersen HS, et al. A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *J Neurochem.* 2002;75(2):471-479.
  41. Kalhan SC, Hanson RW. Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino acid. *J Biol Chem.* 2012;287(24):19786-19791.
  42. Gao X, et al. Serine availability influences mitochondrial dynamics and function through lipid metabolism. *Cell Rep.* 2018;22(13):3507-3520.
  43. Rosenberg D, et al. Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *J Neurosci.* 2013;33(8):3533-3544.
  44. Wolosker H, et al. D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS J.* 2008;275(14):3514-3526.
  45. Paul P, de Bellerocche J. The role of D-serine and glycine as co-agonists of NMDA receptors in motor neuron degeneration and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Front Synaptic Neurosci.* 2014;6:10.
  46. Cholewa JM, et al. Effects of betaine on performance and body composition: a review of recent findings and potential mechanisms. *Amino Acids.* 2014;46(8):1785-1793.
  47. Zhao L, et al. Serum metabolomic analysis of protective effects of Curcuma aromatica oil on renal fibrosis rats. *PLoS One.* 2014;9(9):e108678.
  48. Veskovc M, et al. Betaine modulates oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and Akt/mTOR signaling in methionine-choline deficiency-induced fatty liver disease. *Eur J Pharmacol.* 2019;848:39-48.
  49. Alirezai M. Betaine protects cerebellum from oxidative stress following levodopa and benserazide administration in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(10):950-957.
  50. Matthews RT, et al. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol.* 1999;157(1):142-149.
  51. Lawler JM, et al. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(1):47-52.
  52. Virel A, et al. <sup>1</sup>H NMR profiling of the 6-OHDA parkinsonian rat brain reveals metabolic alterations and signs of recovery after N-acetylcysteine treatment. *Mol Cell Neurosci.* 2019;98:131-139.
  53. Kori M, et al. Metabolic biomarkers and neurodegeneration: a pathway enrichment analysis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *OMICS.* 2016;20(11):645-661.
  54. Graham SF, et al. Biochemical profiling of the brain and blood metabolome in a mouse model of prodromal Parkinson's disease reveals distinct metabolic profiles. *J Proteome Res.* 2018;17(7):2460-2469.
  55. Zhou X, et al. Metabolomics identifies perturbations in amino acid metabolism in the prefrontal cortex of the learned helplessness rat model of depression. *Neuroscience.* 2017;343:1-9.
  56. Shao WH, et al. Combined metabolomics and proteomics analysis of major depression in an animal model: perturbed energy metabolism in the chronic mild stressed rat cerebellum. *OMICS.* 2015;19(7):383-392.
  57. Cai R, et al. Enhancing glycolysis attenuates Parkinson's disease progression in models and clinical databases. *J Clin Invest.* 2019;129(10):4539-4549.
  58. Norwitz NG, et al. The mechanisms by which the ketone body D-β-hydroxybutyrate may improve the multiple cellular pathologies of Parkinson's disease. *Front Nutr.* 2019;6:63.
  59. Chan P, et al. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem.* 1991;57(1):348-351.
  60. Nakano M, et al. ATP Maintenance via two types of ATP regulators mitigates pathological phenotypes in mouse models of Parkinson's disease. *EBioMedicine.* 2017;22:225-241.
  61. Okuzumi A, et al. Metabolomics-based identification of metabolic alterations in PARK2. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6(3):525-536.
  62. Kashiwaya Y, et al. D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(10):5440-5444.
  63. Cheng B, et al. Ketogenic diet protects dopaminergic neurons against 6-OHDA neurotoxicity via up-regulating glutathione in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2009;1286:25-31.
  64. Roberts EL. The support of energy metabolism in the central nervous system with substrates other than glucose. In: Lajtha A, et al, eds. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Brain Energetics. Integration of Molecular and Cellular Processes.* Springer; 2007:137-179.
  65. Pan JW, et al. Human brain beta-hydroxybutyrate and lactate increase in fasting-induced ketosis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(10):1502-1507.
  66. DeVivo DC, et al. Chronic ketosis and cerebral metabolism. *Ann Neurol.* 1978;3(4):331-337.
  67. Ahmed SSS, et al. Metabolic profiling of Parkinson's disease: evidence of biomarker from gene expression analysis and rapid neural network detection. *J Biomed Sci.* 2009;16(1):63.
  68. Miki Y, et al. Alteration of mitochondrial protein PDHA1 in Lewy body disease and PARK14. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;489(4):439-444.
  69. Ghosh A, et al. Mitochondrial pyruvate carrier regulates autophagy, inflammation, and neurodegeneration in experimental models of Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2016;8(368):368ra174.
  70. Quansah E, et al. Targeting energy metabolism via the mitochondrial pyruvate carrier as a novel approach to attenuate neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 2018;131(1):28.
  71. Divakaruni AS, et al. Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death. *J Cell Biol.* 2017;216(4):1091-1105.
  72. Luk KC, et al. Pathological α-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science.* 2012;338(6109):949-953.
  73. Beaudoin-Gobert M, et al. Behavioural impact of a double dopaminergic and serotonergic lesion in the non-human primate. *Brain.* 2015;138(pt 9):2632-2647.
  74. Schwarting RKW, Huston JP. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol.* 1996;49(3):215-266.
  75. Schneider JS, Kovelowski CJ. Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys. *Brain Res.* 1990;519(1-2):122-128.
  76. Fauvelle F, et al. Assessing susceptibility to epilepsy in three rat strains using brain metabolic profiling based on HRMAS NMR spectroscopy and chemometrics. *J Proteome Res.* 2015;14(5):2177-2189.
  77. Ratiney H, et al. Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. *NMR Biomed.* 2005;18(1):1-13.
  78. Beckonert O, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabolomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2692-2703.
  79. Paxinos G, Watson C. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods.* 1997;3(2):129-149.



## Supplemental information

### Supplemental methods

#### 6-OHDA bilateral injection

As previously described(20, 23), rats were subcutaneously injected with desipramine (15 mg/kg) 30 min before 6-OHDA injection in order to protect the noradrenergic neurons. All animals were then anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine-Xylazine (100-7 mg/kg), and placed in a stereotactic frame (Kopf instrument).

Animals received a bilateral injection of 2.3  $\mu$ l 6-OHDA (3 mg/ml) or NaCl 0.9% (sham), at a flow rate of 0.5  $\mu$ l/min according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson(80) and relative to bregma: incisor bar placed at -3.2 mm: anteroposterior (AP) = -5.4 mm / lateral (L) = +/- 1.8 mm / dorsoventral (V) = -8.1 mm. For lesioned animals presenting transient starvation 2–3 days after surgery, supplementation with a high-caloric liquid diet and palatable food was implemented for 1–2 weeks, and stopped 10 days before serum sampling. Animals that did not recover were excluded.

#### Alpha synuclein bilateral injection

As previously described (21), rats were anesthetized with isoflurane 2.5% and placed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments) in order to receive bilateral injections of AAV-hA53T $\alpha$ -syn (1 $\mu$ l-7.0 $\times$ 10<sup>12</sup> vg/ml) or AAV-GFP (7.0  $\times$ 10<sup>12</sup> vg/ml, sham animals) in the SNc (AP = -5.1 mm and -5.6 mm / L = +/- 2.2 mm / V = 8 mm from bregma).

#### Operant self-administration (motivational component)

This task was carried out with a fixed ratio of 1, a single support on the reinforced lever resulting in the deliverance of one reward. Each session ended when 100 rewards were obtained, or at the end of the allotted time (1 hour). The number of rewards obtained was counted for each session by MED-PC IV software.

#### Stepping test (motor component)

The test was carried out three times by two different experimenters, blind to the experimental conditions.

### TH-immunostaining and quantification of striatal DA denervation

After post-fixation with paraformaldehyde 4%, striatal slices were incubated with an anti-TH antibody (mouse monoclonal MAB5280, Millipore, France, 1: 2500) overnight at 4°C. Then slices were incubated with biotinylated goat anti-mouse IgG antibody (BA-9200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; 1: 500). Avidin-peroxidase conjugate revealed immunoreactivity (Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories Burlingame, CA, USA).

Quantification of the extent of striatal dopaminergic denervation was determined with ICS FrameWork computerized image analysis system (Calopix, 2.9.2 version, TRIBVN, Châtillon, France) coupled with a light microscope (Nikon, Eclipse 80i). After drawing masks from three striatal levels, optical densities (OD) were measured for each striatal sub-region (DS and Nacc). OD were expressed as percentages relative to the mean optical density obtained from the homologous regions of sham-operated animals.

### TH-immunostaining human $\alpha$ -synuclein expression

Human  $\alpha$ -synuclein expression levels were revealed in the striatum by immunohistochemistry. The selected sections of the striatum were incubated with a mouse monoclonal antibody raised against human  $\alpha$ -synuclein (clone syn211 Thermo Scientific, MA5-12272, 1:1000) overnight at room temperature and revealed by an anti-mouse peroxidase EnVision™ system (DAKO, K4007) followed by DAB incubation.

### $^1\text{H}$ HRMAS NMR in 6-OHDA rat brain samples

Just before HRMAS analysis, 10  $\mu\text{l}$  D<sub>2</sub>O was added to the inserts containing the brain biopsies, which was then sealed and packed into a 4 mm zirconia MAS rotor.

One-dimension spectra were acquired using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence with a total echo time (TE) of 30 ms and 250  $\mu\text{s}$  interpulse delay. The residual water signal was pre-saturated during 1.7 s of relaxation. Each spectrum using 256 averages lasted 17 minutes).

### $^1\text{H}$ NMR of serum

One-dimension spectra were systematically recorded using a CPMG pulse sequence for edition of metabolite, with TE = 120 ms and 250  $\mu\text{s}$  interpulse delay. The residual water signal was pre-saturated during 2 seconds of relaxation. Each spectrum using 128 averages lasted 10 minutes.

Assignment of peaks was performed using 2-dimension homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (TOCSY) and heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC) spectra of selected samples, and database. When necessary, addition of selected metabolites was used to unravel ambiguous assignments.

### Multivariate statistics

For OPLS/OPLS-DA, the total number of components was determined using the cross-validation procedure, which produces the  $R^2Y$  and  $Q^2$  factors that indicate respectively the goodness of the fit and the predictability of the model. A model is considered as robust and predictive when both factors were  $\geq 0.5$ .

Furthermore, analysis of variance of cross-validated predictive residuals (CV-ANOVA) was used to assess the significance of the model.

### Study approval

Protocols complied with the European Union 2010 Animal Welfare Act and the French directive 2010/63, and were approved by the French national ethics committee (2013/113) n° 004 and by local ethical committee C2EA84 and CELYNE C2EA.

Each PDBP study site's local IRB approved study protocols, and all participants provided written informed consent for participation in PDBP. As one goal of the PDBP is to provide a biorepository of samples from a well-characterized set of individuals, participants consented to sharing of samples and deidentified data with investigators approved by the Biospecimen Review Access Committee at the time of enrollment.

## Supplemental data

### Supplemental tables

#### Supplemental Table 1

Patient	Cohort	Sex	Age (Years)	Duration (months)	H&Y	UPDRS.I	UPDRS.II	UPDRS.III	Treatment
1	NIH	F	59	10	0	8	6	4	N/A
2	NIH	M	65	8	2	15	11	20	N/A
3	NIH	M	63	1	1	2	11	14	N/A
4	NIH	M	63	2	3	13	10	36	N/A
5	NIH	M	68	8	2	-	-	38	N/A
6	NIH	M	71	7	2	6	6	29	N/A
7	NIH	F	62	5	2	7	4	38	N/A
8	NIH	F	51	3	2	6	11	16	N/A
9	NIH	M	58	10	2	5	15	13	N/A
10	NIH	M	69	7	2	-	-	17	N/A
11	NIH	F	51	1	4	-	-	45	N/A
12	NIH	F	53	9	2	4	2	14	N/A
13	NIH	F	58	1	2	14	6	10	N/A
14	NIH	F	52	8	2	5	8	10	N/A
15	NIH	M	62	0	1	3	7	12	N/A
16	NIH	M	43	7	1	4	5	12	N/A
17	NIH	F	75	2	2	9	8	12	N/A
18	NIH	M	78	7	1	16	8	6	N/A
19	NIH	F	53	5	2	8	8	17	N/A
20	Italy first	F	68	12	2	-	-	10	N/A
21	Italy first	M	53	12	1	-	-	10	N/A
22	Italy first	M	71	24	1.5	-	-	10	N/A
23	Italy first	-	-	-	-	-	-	-	N/A
24	Italy first	F	67	12	1.5	-	-	8	N/A
25	Italy first	M	44	12	1	-	-	8	N/A
26	Italy first	F	64	12	2	-	-	10	N/A
27	Italy first	-	-	-	-	-	-	-	N/A
28	Italy first	M	68	-	-	-	-	-	N/A
29	Italy first	F	54	24	-	-	-	6	N/A
30	Italy first	F	65	12	1	-	-	6	N/A
31	Italy first	F	71	24	-	-	-	14	N/A
32	Italy first	M	63	24	-	-	-	24	N/A
33	Italy first	M	59	12	1.5	-	-	4	N/A
34	Italy first	M	61	-	-	-	-	14	N/A
35	Italy first	M	66	0	1.5	-	-	14	N/A
36	Italy first	M	76	12	1	-	-	1	N/A
37	Italy first	M	72	12	-	-	-	24	N/A
38	Italy first	M	42	24	-	-	-	26	N/A
39	Italy first	M	58	0	1.5	-	-	10	N/A
40	Italy first	F	49	36	-	-	-	9	N/A
41	Italy first	M	67	12	1	-	-	3	N/A
42	Italy first	M	57	-	1	-	-	2	N/A
A	NIH	M	66	0	2	-	-	31	Pra
B	NIH	M	69	10	2	-	-	43	Pra
C	NIH	F	62	1	2	-	-	45	Pra
D	NIH	M	82	11	2	17	18	22	Pra
E	NIH	M	62	4	2	17	13	11	Pra
F	NIH	M	63	7	2	5	1	15	Pra
G	NIH	M	69	3	2	7	12	21	Pra
H	NIH	F	58	10	2	13	3	9	Pra
I	NIH	M	70	5	3	10	7	30	Pra

F = Female; M = Male; Duration = Duration from diagnosis (NIH) or symptoms onset (Italy) ; H&Y = Hoehn and Yahr scale; UPDRS = MDS - Unified Parkinson disease rating scale; Pra = Pramipexole; N/A = not applicable

**Table S1: Clinical characteristics of PD patients**

## Supplemental Table 2

Metabolite	Group	<sup>1</sup> H ppm	<sup>13</sup> C ppm	Multiplicity
3-hydroxybutyrate	γ-CH <sub>3</sub>	1.19	24,4	d
	half α-CH <sub>2</sub>	2.30	49,2	dd
	half α-CH <sub>2</sub>	2.39	49,2	dd
	β-CH	4.15		m
Acetoacetate		3,44		s
		2,27		s
Acetate	CH <sub>3</sub>	1.91	25.9	s
Acetone	CH <sub>2</sub> CO	2.22	32,9	s
Alanine	CH <sub>3</sub>	1.47	18.8	d
	α-CH	3.77	53.5	q
Albumin lysyl	ε-CH <sub>2</sub>	2.88	42.0	t
	ε-CH <sub>2</sub>	2.95	41.9	t
	ε-CH <sub>2</sub>	3.01	42.0	t
Arginine	γ-CH <sub>2</sub>	1.64		
	γ-CH <sub>2</sub>	1.69		
	β-CH <sub>2</sub>	1.89		
	δ-CH <sub>2</sub>	3.23	43.2	t
Aspartate	half β-CH <sub>2</sub>	2.66		q
	half β-CH <sub>2</sub>	2.80		dd
Betaine	CH <sub>2</sub>	3,9		s
	CH <sub>3</sub>	3.26		s
Cholesterol	C18 (in HDL)	0.66		m
	C18 (in VLDL)	0.68		
	C26 and C27	0.83	25.2	m
Choline	N (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3.21	56.7	s
		3.51		
		4.06		
Citrate	half CH <sub>2</sub>	2.53		d
	half CH <sub>2</sub>	2.66		d
Creatine	CH <sub>3</sub>	3.03		s
	CH <sub>2</sub>	3.92		s
Creatinine	CH <sub>3</sub>	3.04		s
	CH <sub>2</sub>	4.05		s
Dimethylamine	CH <sub>3</sub>	2.71		s
Ethanol	CH <sub>3</sub>	1.17	21.6	t
	CH <sub>3</sub> COH	3.65		q
Fatty acids (mainly LDL)	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	0.84	16.5	m
	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1.27	32.2	m
Fatty acids (mainly VLDL)	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C=	0.86		m
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO	1.57	27.4	m
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO	1.29		m

Fatty acids	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	0.93	21.05	m
	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1.24	34.4	m
	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1.26	25.2	m
	CH <sub>2</sub>	1.26	19.2	m
	CH <sub>2</sub>	1.30		m
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C=C	1.68	29.2	

Metabolite	Group	<sup>1</sup> H ppm	<sup>13</sup> C ppm	Multiplicity
Fatty acids	CH <sub>2</sub> C=C	2.00	29.7	m
	CH <sub>2</sub> CO	2.22	36.3	m
	C=CCH <sub>2</sub> C=C	2.72	28.1	m
	CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH	5.26	130.6	m
	CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH	5.29	132.2	m
Formate	CH	8.45		s
Fructose		3.99		m
		4.01		dd
Fucose / β-Galactose		4.54		d
Glucose	H2	3.24	76.9	t
	H4	3.40	72.4	t
	H4	3.41	72.4	t
	H5	3.46	78.6	m
	H3	3.48	78.5	t
	H2	3.53	74.3	q
	H3	3.71	75.6	t
	half CH <sub>2</sub> -C6	3.72	63.5	q
	half CH <sub>2</sub> -C6	3.76	63.4	m
	H5	3.82	74.2	ddd
	half CH <sub>2</sub> -C6	3.84	63.4	m
	half CH <sub>2</sub> -C6	3.89	63.5	dd
	H1	4.64	98.7	d
	H1	5.23	94.9	d
Glutamate	half β-CH <sub>2</sub>	2.04		m
	half β-CH <sub>2</sub>	2.12		m
	half γ-CH <sub>2</sub>	2.34	33.9	m
	half γ-CH <sub>2</sub>	2.36		m
		3.74		m
Glutamine		2.08		
		2.09		
	half β-CH <sub>2</sub>	2.11	29.7	m
	half γ-CH <sub>2</sub>	2.44	33.9	m
		2.46	57.4	m
		3.74		
Glycerol	half CH <sub>2</sub>	3.56	65.8	q
	half CH <sub>2</sub>	3.65	65.6	q
	C <sub>2</sub> -H	3.87	74.6	m
Glycerophosphocholine		3.22		s
	NCH <sub>2</sub>	3.66	68.7	m

	OCH <sub>2</sub>	4.29	62.2	m
Glycerol backbone		4.06		

Metabolite	Group	<sup>1</sup> H ppm	<sup>13</sup> C ppm	Multiplicity
PGLYs and TAGs	CHOCOR	4.22		
		5.20		
Glycine	CH <sub>2</sub>	3.55	44.3	s
Histidine		3.09		dd
		3.98		dd
	H4	7.04		s
	H2	7.75		s
Isoleucine	δ-CH <sub>3</sub>	0.93	13,9	t
	β-CH <sub>3</sub>	1.00	17,15	d
	half γ-CH <sub>2</sub>	1.24		
	half γ-CH <sub>2</sub>	1.46		
		1.96		
		3.65		
Lactate	CH <sub>3</sub>	1.32	22.7	d
	CH	4.11	71.2	q
Lactose		3.55		
		3.66		
		3.97		
		4.45		
Leucine	δ-CH <sub>3</sub>	0.95		d
	δ-CH <sub>3</sub>	0.96		d
		1.66		m
		1.70	42.7	m
		1.73		m
	α-CH	3.71		
Lysine	γ-CH <sub>2</sub>	1.43		m
	γ-CH <sub>2</sub>	1.49		m
	δ-CH <sub>2</sub>	1.72		m
	β-CH <sub>2</sub>	1.88		m
	β-CH <sub>2</sub>	1.91		m
		3.02		t
		3.74		t
Mannose		4.89		d
		5.18		d
Methanol	CH <sub>3</sub> OH	3.35		s
Methionine		2,64	31,4	t
Methionine		2.15		s
Myo-inositol		4.05		
		3.27		t
N-acetyl-glycoprotein 1	NHCOCH <sub>3</sub>	2.04	24.7	s
N-acetyl-glycoprotein 2	NHCOCH <sub>3</sub>	2.07	25	s

Metabolite	Group	<sup>1</sup> H ppm	<sup>13</sup> C ppm	Multiplicity
Phenylalanine	half β-CH <sub>2</sub>	3.26		
	α-CH	3.97		
	H2, H6	7.31		d
	H4	7.35		m
	H3, H5	7.40		m
Proline	γ-CH <sub>2</sub>	1.98		m
	γ-CH <sub>2</sub>	2.01		m
	half β-CH <sub>2</sub>	2.05		m
	half β-CH <sub>2</sub>	2.34		m
	half δ-CH <sub>2</sub>	3.33		m
	α-CH	4.12		m
Succinate		2.39		s
Threonine	γ-CH <sub>3</sub>	1.31		d
	α-CH	3.55		d
	β-CH	4.23		m
Trehalose		3.40	74.3	
Tyrosine		6.88		d
	H2, H6	7.18		d
Valine	CH3	0.98	19.4	d
	CH3	1.03	20.6	d
	β-CH	2.26		m
	α-CH	3.60	63.4	d
Urea	NH <sub>2</sub> C=ONH <sub>2</sub>	5.77		
Xylose		3.41	78.6	

**Table S2: List of metabolites identified in serum samples.**

For each metabolite, chemical group, assignment for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C and multiplicity of peak are presented.

Multiplicity: singulet (s), doublet (d), doublet doublet (dd), multiplet (m)



## Supplemental Table 3

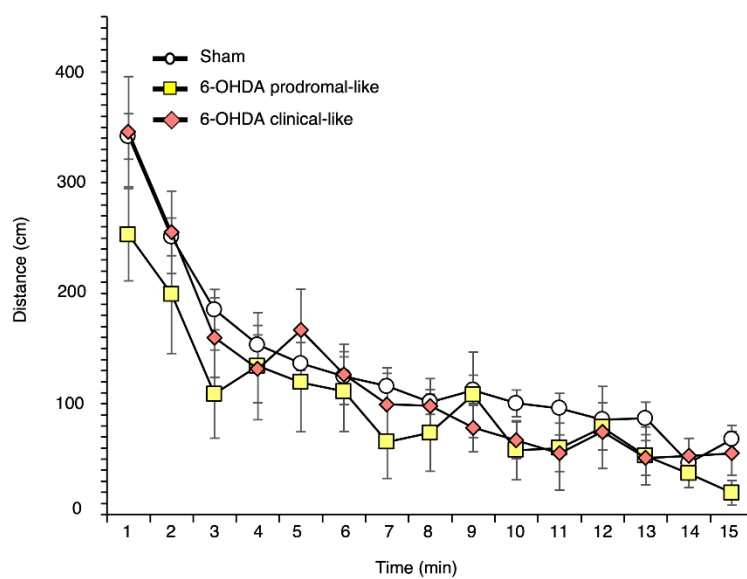
Supplemental Table 3: Clinical characteristics of additional PD patients									
Patient	Cohort	Sex	Age (Years)	Duration (months)	H&Y	UPDRS.I	UPDRS.II	UPDRS.III	Treatment
1	Italy second	M	72	<12	1,5	-	-	9	N/A
2	Italy second	M	69	12-18	1	-	-	6	N/A
3	Italy second	F	48	12-18	1	-	-	5	N/A
4	Italy second	M	55	<12	1	-	-	9	N/A
5	Italy second	M	83	12-18	1,5	-	-	12	N/A
6	Italy second	M	80	<12	1	-	-	17	N/A
7	Italy second	F	55	<12	1,5	-	-	23	N/A
8	Italy second	M	60	<12	1,5	-	-	12	N/A
9	Italy second	F	65	<12	1	-	-	3	N/A
10	Italy second	M	44	<12	1	-	-	7	N/A
11	Italy second	M	55	12-18	2	-	-	18	N/A
12	Italy second	M	73	<12	1	-	-	23	N/A
13	Italy second	F	75	12-18	1	-	-	12	N/A
14	Italy second	F	64	12-18	1	-	-	7	N/A
15	Italy second	M	75	12-18	2	-	-	13	N/A
16	Italy second	M	46	12-18	1	-	-	1	N/A
17	Italy second	M	63	12-18	1,5	-	-	25	N/A
18	Italy second	M	63	12-18	1	-	-	15	N/A
19	Italy second	M	58	12-18	2,5	-	-	19	N/A
20	Italy second	M	50	12-18	1	-	-	10	N/A
21	Italy second	F	61	12-18	1,5	-	-	7	N/A
22	Italy second	M	38	<12	1,5	-	-	10	N/A
23	Italy second	F	76	12-18	1,5	-	-	21	N/A
24	Italy second	M	60	12-18	1	-	-	4	N/A
25	Italy second	F	56	<12	1	-	-	8	N/A
26	Italy second	F	56	12-18	1	-	-	7	N/A
27	Italy second	F	73	<12	1	-	-	7	N/A
28	Italy second	M	69	<12	1,5	-	-	18	N/A
29	Italy second	M	50	<12	1	-	-	22	N/A
30	Italy second	M	48	12-18	1	-	-	11	N/A
31	Italy second	F	53	<12	1	-	-	10	N/A
32	Italy second	M	79	12-18	1	-	-	18	N/A
33	Italy second	F	53	12-18	1	-	-	11	N/A
34	Italy second	M	63	<12	1	-	-	10	N/A
35	Italy second	M	77	12-18	2	-	-	20	N/A
36	Italy second	M	71	12-18	2,5	-	-	22	N/A

F = Female; M = Male; Duration = Duration from symptoms onset ; H&Y = Hoehn and Yahr scale; UPDRS = MDS - Unified Parkinson disease rating scale; Pra = Pramipexole; N/A = not applicable

**Table S3: Clinical characteristics of additional PD patients from Italy (Second cohort)**

## Supplemental figures

### Supplemental Figure 1

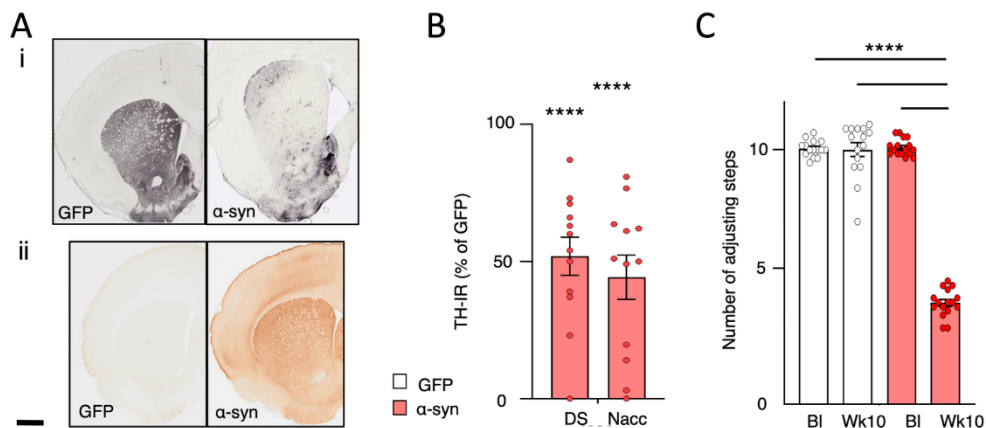


#### Figure S1: Ambulatory motor activity measured in an open field.

Dopaminergic lesions did not affect horizontal ambulatory activity measuring in an open area for 15-min.

Data are presented by mean value  $\pm$  SEM for each minute.

## Supplemental Figure 2



**Figure S2: AAV-hA53T $\alpha$ -syn vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in rat SNc, induces striatal dopaminergic degeneration associated with  $\alpha$ -syn overexpression and leads to fine motor dysfunction.**

(A-B) Examples of coronal sections of GFP and  $\alpha$ -syn rat brains stained for TH (A) and human  $\alpha$ -syn (B). Scale bar represents 1mm.

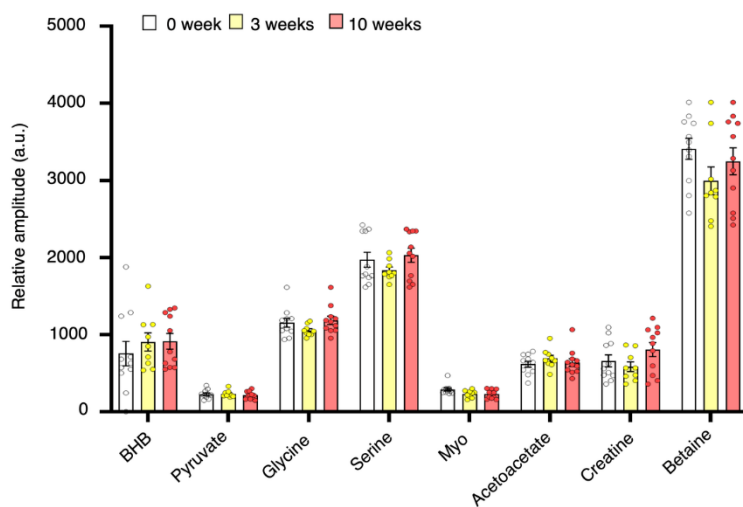
(C) Quantification of TH-IR staining at the striatal level, expressed as percentage of the mean value obtained for GFP animals ( $n = 12$ ). We observe a large decrease of TH-positive neurons in DS after 10 weeks in alpha-synuclein animals ( $n = 12$ ).

(D)  $\alpha$ -syn injection reduced the number of adjusting steps in a stepping procedure after 9 weeks. Results are expressed as the mean number of forelimb adjustments for two trials at baseline (left bar) and 9 weeks (right bar) for GFP ( $n=12$ ) and alpha-synuclein animals ( $n=12$ ).

*BL: Baseline ; Wk10: Week 10 ;  $\alpha$ -syn: alpha synuclein*

Means  $\pm$  SEM \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ , Two-way ANOVA or RM-ANOVA followed by post-hoc Tukey test.

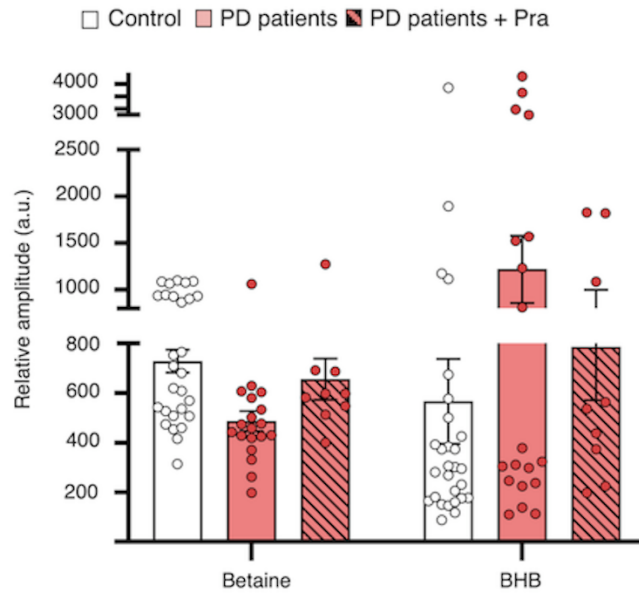
### Supplemental Figure 3



**Figure S3: GFP viral infusion induces metabolic dysregulation in serum samples.**

Representative histogram showing relative quantitative variations of signal between samples from GFP animals for acetoacetate, betaine, BHB, creatine, glycine, myo-inositol, pyruvate, serine, the key metabolites implicated in discrimination of 3 groups in OPLS-DA of alpha synuclein animals. White bar corresponds to samples at week 0 (n = 11), yellow to 3 weeks post GFP infusion (n = 9) and red to after 10 weeks (n = 11). Data are presented as mean values  $\pm$  SEM and tested by one-way ANOVA followed by posthoc test of Tukey.

## Supplemental Figure 4



**Figure S4: BHB and betaine levels are partially normalized in NIH PD patients treated with pramipexole.**

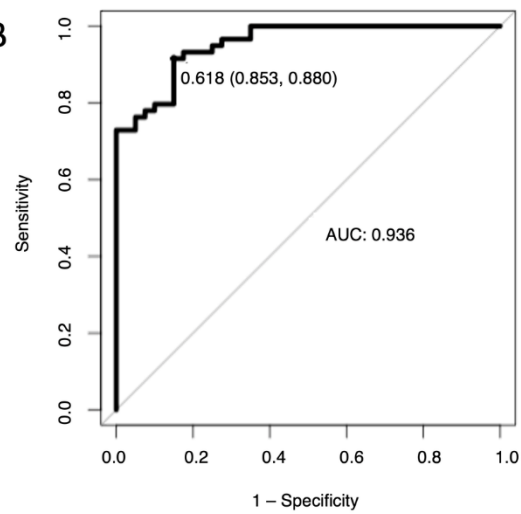
Representative histogram showing relative quantitative variations of signal between Control (white bar, n = 29), PD patients (red bar, n = 19) and PD patients treated with Pra (hatched bar, n = 9) for BHB and betaine. Data are presented as mean values  $\pm$  SEM.

## Supplemental Figure 5

A

$$\begin{aligned} \text{logit}(P) &= \log(P/(1 - P)) \\ &= 132.29 - 0.45 \text{ BHB} - 0.82 \text{ Pyruvate} + 0.36 \text{ Valine} + 0.17 \\ &\quad \text{Acetoacetate} - 0.39 \text{ Creatine} + 0.07 \text{ Betaine} \end{aligned}$$

B



**Figure S5: Logistic regression curve for panel of serum metabolites included: BHB, acetoacetate, valine, creatine, betaine and pyruvate.**

(A) ROC curve from serum samples of all PD-like animal models. AUC = 0.954, sensitivity: 0.85, specificity: 0.915.

(B) Algorithm of logistic regression for all PD-like animals (n = 48) vs shams (n = 39).



## B. Article II - Re-routing metabolism by the mitochondrial pyruvate carrier inhibitor MSDC-0160 attenuates neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease

**Contexte et objectifs :** De plus en plus de preuves soutiennent l'idée que le dysfonctionnement mitochondrial pourrait représenter une caractéristique clé de la maladie de Parkinson. En tant que régulateur central de la production d'énergie, les mitochondries sont également impliquées dans plusieurs autres fonctions cellulaires essentielles telles que les voies de mort cellulaire et la neuroinflammation, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle pour la maladie de Parkinson. De manière intéressante, des études récentes ont rapporté un effet neuroprotecteur du blocage du transporteur de pyruvate mitochondrial (MPC) par le biais du sensibilisateur à l'insuline MSDC-0160, dans le contexte de la maladie de Parkinson. En tant que seul point d'entrée du pyruvate dans la matrice mitochondriale, le MPC joue un rôle crucial dans le métabolisme énergétique qui est affecté dans la maladie de Parkinson. Dans ce contexte, nous avons étudié les mécanismes qui sous-tendent l'effet neuroprotecteur du MSDC-0160.

**Méthodologie :** Nous avons étudié l'impact comportemental, cellulaire et métabolique d'un traitement chronique au MSDC-0160 dans un modèle unilatéral de rat 6-OHDA de la maladie de Parkinson. Nous avons évalué les différentes voies pouvant fournir de l'énergie au niveau mitochondriale en mesurant les niveaux d'expression des enzymes indispensables à ces voies à partir de biopsies du striatum dorsal, ainsi que le niveau des métabolites dans des échantillons de sérum en utilisant la métabolomique par résonance magnétique nucléaire.

**Principaux résultats :** Le traitement par MSDC-0160 chez des rats 6-OHDA unilatéraux a permis une amélioration du comportement moteur, a diminué la dénervation dopaminergique, réduit l'activité de mTOR et la neuroinflammation. De façon concomitante, l'administration de MSDC-0160 a fortement modifié le métabolisme énergétique comme le révèle l'augmentation de la cétogenèse, de la beta oxydation et de l'oxydation du glutamate, pour répondre aux besoins énergétiques et maintenir l'homéostasie énergétique.



**Conclusion** : Cette étude contribue à une meilleure compréhension du potentiel du MSDC-0160 comme traitement neuroprotecteur, via la reprogrammation du métabolisme par l'inhibition du MPC.



1 the expression of pivotal mitochondrial enzymes in dorsal striatal biopsies and the level of  
2 metabolites in serum samples using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)-based  
3 metabolomics.

4 **Results:** MSDC-0160 treatment in unilateral 6-OHDA rats improved motor behavior, decreased  
5 dopaminergic denervation and reduced mTOR activity and neuroinflammation. Concomitantly,  
6 MSDC-0160 administration strongly modified energy metabolism as revealed by increased  
7 ketogenesis, beta oxidation and glutamate oxidation to satisfy energy needs and maintain energy  
8 homeostasis.

9 **Conclusion:** MSDC-0160 exerts its neuroprotective effect through reorganization of multiple  
10 pathways connected to energy metabolism.

11 **Keywords:** Parkinson's disease, Neuroprotection, Mitochondrial pyruvate carrier, Energy  
12 metabolism

13

## 14 **Introduction**

15

16 Parkinson's disease (PD), mainly characterized by the progressive loss of dopaminergic  
17 neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc), is the second neurodegenerative pathology  
18 worldwide. It remains incurable, possibly because of its particularly complex etiology [1].

19 Various mitochondrial alterations have been highlighted as major actors in the cascade of events  
20 leading to the degeneration of dopaminergic neurons[2–5]. Indeed, beyond their prominent role

21 in energy metabolism, mitochondria are involved in several other essential functions  
22 dysregulated in PD, including the activation of cell death pathways such as the mammalian

23 target of rapamycin (mTOR), which regulates autophagy[3, 6, 7]. Alteration of mitochondria

24 has also been shown to be associated with neuroinflammatory processes, especially through the

25 accumulation of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), which leads to nitric

1 oxide formation, an inhibitor of mitochondrial respiration[8, 9]. Yet most of the therapeutic  
2 strategies focusing on these processes have failed, probably because treatments have targeted  
3 them individually[10–12]. In contrast, reprogramming mitochondrial metabolism, by targeting  
4 upstream reactions in the signaling cascades, may represent a more efficient therapeutic strategy  
5 in PD[13, 14].

6       Among various potential sites of action, pyruvate metabolism, critical for energy  
7 generation[15], has emerged as a promising therapeutic target. Indeed, as the end-product of  
8 glycolysis and at the entry to mitochondrial metabolism, pyruvate represents the main fuel  
9 supply of the tricarboxylic acid (TCA) cycle[15] and its metabolism plays a key role in cell  
10 homeostasis[16]. Strikingly, abnormally high levels of pyruvate have been observed in PD  
11 patients[15, 17, 18], reflecting alteration in its metabolism. Consistently, using nuclear  
12 magnetic resonance (NMR)-based metabolomics in a recent study combining three different  
13 PD animal models and two independent PD patients cohorts, we have identified a set of  
14 metabolic dysregulations which strongly suggest that modification of pyruvate metabolism is  
15 associated with PD pathophysiology and progression[19]. In particular, glycolytic metabolites,  
16 including pyruvate, were increased whereas the TCA cycle metabolites remained stable. This  
17 suggests that cytosolic glycolysis and mitochondrial TCA cycle are decoupled, impacting the  
18 supply of energy. Concomitantly, ketone bodies and amino acids were increased, suggesting  
19 that other fuel sources were being used to maintain the TCA cycle[19].

20       Coordination between glycolysis and mitochondrial activities depends on the entry of  
21 pyruvate into the mitochondrial matrix, by the mitochondrial pyruvate carrier (MPC) which  
22 thus appears pivotal for modulating the cell energy production[20–22]. Indeed, previous studies  
23 have shown that MPC knockdown results in compensatory use of other substrates, such as  
24 amino acids, fatty acids and ketone bodies, a phenomenon highly reminiscent of our previous  
25 work[23, 24]. Additionally, MPC inhibition by an insulin sensitizer thiazolidinedione

1 compound (TZD) compound, the MSDC-0160, in a MPTP mice model of PD has been found  
2 to limit dopaminergic denervation and to reduce associated motor impairments, through a  
3 mechanism that involves modulation of mTOR signaling. These effects of MSDC-0160  
4 included normalization of autophagy, decreased neuroinflammation and reduced iNOS  
5 expression[25]. Interestingly, TZD such as MSDC-0160, which specifically target MPC[26],  
6 can reduce pyruvate entry into mitochondria. Reduced activity of MPC in cultured  
7 dopaminergic neurons protects them from excitotoxic death[27]and observational clinical  
8 studies have shown that, compared to other antidiabetic drugs, the use of TZDs in diabetic  
9 patients is associated with a reduction of PD incidence [28].

10 In light of these observations, we hypothesized that MPC dysfunction may be the cause  
11 of the metabolic dysregulations we observed in our previous study[19], and that inhibiting MPC  
12 could therefore be neuroprotective. To validate the neuroprotective action of MSDC-0160, we  
13 first characterized its effects at a behavioral and histological level in unilateral 6-  
14 hydroxydopamine (6-OHDA) PD rats. Then we explored the metabolic cell processes  
15 underlying the mechanism of action of MSDC-0160 in this model, initially focusing on  
16 mitochondrial metabolism known to be altered by 6-OHDA cytotoxicity [29–31].

17

18 As predicted from murine models of PD, behavioral and histological results confirmed that  
19 MSDC-0160 treatment protected against dopaminergic denervation and resulting motor  
20 dysfunction in the 6-OHDA rat model. Exploration of the cell processes involved demonstrated  
21 that treatment with MSDC-0160 normalized mTOR signaling and iNOS expression in these PD  
22 animals. Finally, from a metabolic standpoint, we found that MSDC-0160 treatment was  
23 associated with an increased use of lipids and ketones bodies as alternative fuel sources.  
24 Altogether, these findings suggest that MSDC-0160 treatment could exert its neuroprotective  
25 action through two different ways: the promotion of compensatory metabolic adaptation and

1 the limitation of neuroinflammatory and apoptotic mechanisms. Altogether, these results  
2 strongly support MPC inhibition as a highly relevant therapeutic strategy in PD by  
3 counteracting some quintessential pathophysiological processes.

4

## 5 **Material and Methods**

6

### 7 • Animals

8

9 Experiments were performed on adult male Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest-Saint-  
10 Isle, France), weighing approximately 250 g (5 weeks old) at the beginning of the experiment.  
11 They were housed under standard laboratory conditions with reversed light-dark cycle (12  
12 h/light/dark cycle, with lights ON at 7 p.m.) and with food and water available *ad libitum*.

13

### 14 • 6-OHDA rat model

15

16 As previously described[32, 33], rats were subcutaneously injected with desipramine (15  
17 mg/kg) 30 min before 6-OHDA (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) injection in  
18 order to protect the noradrenergic neurons. All animals were then anesthetized by  
19 intraperitoneal injection of Ketamine (Chlorkétam, 100 mg/kg, Merial SAS, Lyon, France) and  
20 Xylazine (Rompun, 7 mg/kg, Bayer Santé, Puteaux, France) and placed in a stereotactic frame  
21 (Kopf instrument, Phymep, Paris, France). The stereotaxic coordinates of the injection sites,  
22 according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson[34] and relative to interaural line, were  
23 as follows: incisor bar placed at -3.2 mm; anteroposterior (AP) = +3.8 mm / lateral (L) = +/-  
24 2.2 mm / dorsoventral (V) = -8.1 mm. Animals received a unilateral injection (counterbalanced

1 side) of 3  $\mu$ l 6-OHDA (3  $\mu$ g/ $\mu$ l, 6-OHDA group) or 0.9% NaCl (sham group), at a flow rate of  
2 0.5  $\mu$ l/min.

3

4 • MSDC-0160 treatment

5 In accordance with previous studies[25, 35], rats received a daily dose of MSDC-0160 (30  
6 mg/kg, Metabolic Solutions Development Company, Kalamazoo, USA) or placebo (1%  
7 methylcellulose with 0.01% Tween 80) by oral gavage, 4 days before unilateral injection of 6-  
8 OHDA or NaCl into the SNc (Sham placebo n=12; Sham MSDC-0160 n=9; 6-OHDA placebo  
9 n=13; 6-OHDA MSDC-0160 n=14), and continuing for 14 days after surgery, during the  
10 development and stabilization of the 6-OHDA lesion [36]. Finally, rats were euthanized 10 h  
11 after the last administration of MSDC-0160 and after tail-blood collection.

12

13 • Behavioral assessment

14

15 At the end of treatment, locomotor asymmetry was measured with the cylinder test[37].  
16 Animals were placed for 5 min in a cylinder, 20 cm high and 20 cm in diameter, and their  
17 forelimb use during rearing was videotaped (OBS studio open-source software). The test was  
18 carried out blind to the experimental conditions. Slow motion recorded videos were viewed to  
19 count the number of forelimbs uses, defined by the placement of the whole palm on the wall of  
20 the arena. Unilateral lesion with 6-OHDA resulted in preferential use of the ipsilateral forelimb  
21 paw [37].

22

23 • Histological analysis

24

1 After behavioral assessment (i.e. 2 weeks after 6-OHDA or saline injection) and blood  
2 collection, rats a light gaseous anesthesia were euthanized by decapitation and brains were  
3 immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.  
4 They were then cut in 14  $\mu$ m coronal sections at -20 °C using a cryostat (Microm HM 525;  
5 Microm, Francheville, France).  
6 Only animals with correct cannula implantation, verified by Cresyl violet staining, were  
7 included in the study to ensure homogeneous induction of the lesional process in every  
8 experimental condition (Additional file 1: Fig. S1).  
9 Tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining was carried out as previously described[19, 32,  
10 33] on striatal and SNc sections at levels of interest (striatum: AP: +2.0/+1.6/+1.0; SNc AP: -  
11 4.8/-5.2/-5.6 related to Bregma). Briefly, after post-fixation with 4% paraformaldehyde, slices  
12 were incubated with an anti-TH antibody (mouse monoclonal MAB52 80, Millipore, France,  
13 1: 2500) overnight at 4°C. Then slices were incubated with biotinylated goat anti-mouse IgG  
14 antibody (BA-9200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; 1: 500) and immunoreactivity  
15 revealed with Avidin-peroxidase conjugate (Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories  
16 Burlingame, CA, USA).  
17 Quantification of the extent of striatal dopaminergic denervation was determined with ICS  
18 FrameWork computerized image analysis system (Calopix, 2.9.2 version, TRIBVN, Châtillon,  
19 France) coupled with a light microscope (Nikon, Eclipse 80i). After drawing masks from three  
20 striatal levels, optical densities (OD) were measured. OD are expressed as percentages relative  
21 to the mean optical density obtained from the corresponding contralateral region for each  
22 animal.  
23 For western blot analysis for each animal, thick sections (80  $\mu$ m) of dissected dorsal striatum  
24 (DS) tissue were pooled in an Eppendorf® and kept at -80°C until analysis.

25



1                   • Western blot analysis

2    Striatum samples were homogenized by sonication in SDS buffer (10%). After determining the  
3    dynamic range of detection for each antibody, 20 µg of total protein were resolved in 4-20%  
4    SDS-PAGE and then transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes using the  
5    Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-rad). Briefly, membranes were incubated overnight at  
6    4°C with primary antibodies of interest anti-: TH (Cell Signaling; s58844), mTOR (Cell  
7    Signaling; s2983), p-mTOR (Cell Signaling; s5536), iNOS (Cell Signaling; s13120), MPC1  
8    (Cell Signaling; s14462), pyruvate dehydrogenase (Cell Signaling; s3205), p-pyruvate  
9    dehydrogenase (Cell Signaling; s31866), acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1 (Cell  
10    Signaling; s44276), carnitine palmitoyltransferase 1a (Cell Signaling; s97361), glutamate  
11    dehydrogenase (Cell Signaling; s12793), vinculin (Cell Signaling; s13901), βactin (Cell  
12    Signaling; s4970). After washing, membranes were incubated 1h at room temperature with  
13    HRP-linked goat anti-rabbit antibody (Cell Signaling; s7074). Bands were detected using  
14    enhanced chemiluminescence (ECL) and their densities quantified using ImageLab software  
15    (Bio-rad). Each band was delimited manually, and densities were normalized by dividing by  
16    the density of controls[38].

17

18                   • NMR experiments

19

20    Blood was collected from the caudal vein under gas anesthesia with isoflurane (2%) and after  
21    2 h of fasting, as previously described [19]. It was then stored on ice before rapid centrifugation  
22    at 1600g for 15 min at 4° C. The supernatant serum was removed and stored at -80°C until the  
23    day of NMR. The time before freezing never exceeded 30 min[39].

1 NMR tubes were filled with 60  $\mu$ l serum sample and 120  $\mu$ l phosphate buffer saline (PBS) 0.1M  
2 in D<sub>2</sub>O (50% of D<sub>2</sub>O, pH = 7.4). <sup>1</sup>H NMR experiments were performed on a Bruker Advance  
3 III NMR spectrometer at 950 MHz (IBS, Grenoble, France) using a cryo-probe with a 3 mm  
4 tube holder. For each sample, two one-dimensional <sup>1</sup>H-NMR spectra were acquired: one  
5 metabolite-edited spectrum using the Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence  
6 and one lipid-edited spectrum using diffusion filtering (ledbpgppr2s pulse sequence). The  
7 residual water signal was pre-saturated for 2 seconds. Assignment of peaks was performed  
8 using 2-dimensional experiments and databases[40]. Then, as previously described, metabolite  
9 relative concentrations were extracted from CPMG spectra[19] and mean chain length and  
10 unsaturation were calculated from diffusion-edited spectra[41]. The total acquisition time lasted  
11 20 minutes.

12 The free induction decays were Fourier transformed and manually phased with the Bruker  
13 software Topspin version 3.6.2. Then, further pre-processing steps (baseline correction,  
14 alignment, bucketing) were performed using NMRProcFlow v1.4 online  
15 (<http://nmrprocflow.org>). The spectra were segmented in 0.001 ppm buckets between 0 and 8.5  
16 ppm with exclusion of residual water peaks, macromolecule signals (for CPMG) and other  
17 regions corresponding to pollution. Each bucket was normalized per spectrum to the sum of all  
18 buckets.

19

20 • Statistical analysis

21 All univariate analyses were performed using Graphpad Prism 8 software (San Diego–USA).

22 All results were expressed as mean values  $\pm$  standard error of mean (SEM). Parametric analyses  
23 were performed after verification of the assumptions of normality (Shapiro-Wilk and  
24 Kolmogorov-Smirnov tests) and sphericity (Bartlett’s test). For all results, two-way ANOVA

1 followed by a post-hoc Tukey test with correction for multiple comparisons were performed.  
2 Significance for p values was set at  $\alpha = 0.05$ .

3

4

## 5 **Results**

### 6 **Treatment with MSDC-0160 induced neuroprotection in unilateral 6-OHDA PD rats**

7 We first tested whether chronic MSDC-0160 administration could protect SNc DA neurons and  
8 limit associated motor impairment in a 6-OHDA rat model with severe unilateral DA lesion.

9 As expected, a significant loss of dopaminergic neurons of the SNc and of their projections in  
10 the striatum was observed in 6-OHDA rats 2 weeks after surgery, (Fig. 1A and 1C; main effect  
11 of lesion:  $F_{1,44} = 258.7$ ,  $p < 0.001$ ), as visualized by loss of TH expression in the striatum (Fig.  
12 1B and 1D; main effect of lesion:  $F_{1,44} = 37.29$ ,  $p < 0.0001$ ). The 6-OHDA-induced neuronal  
13 damage and striatal DA denervation were significantly attenuated in animals treated with  
14 MSDC-0160 (Fig. 1A and 1C; main effect of lesion and treatment and significant interaction  
15 between both factors:  $F_s > 13.62$ ,  $p_s < 0.0004$ ; Fig. 1B and 1D; main effect of lesion and  
16 treatment  $F_s > 8.59$ ,  $p_s < 0.001$ ), whereas MSDC-0160 alone had no effect on these parameters  
17 (Fig. 1A and 1C; post-hoc test of Tukey adjusted p value  $> 0.99$ ; Fig. 1B and 1D; post-hoc test  
18 of Tukey adjusted p value  $> 0.61$ ).

19 At the end of treatment, the evaluation of the sensori-motor function of the rats using the  
20 cylinder test showed that unilateral 6-OHDA rats had significant motor impairment, with a  
21 dramatic decrease of contralateral forelimb use consistently with previous reports[42, 43] (Fig.  
22 1E; main effect of lesion:  $F_{1,44} = 161.2$ ,  $p < 0.001$ ). Chronic MSDC-0160 treatment almost  
23 completely prevented these deficits (Fig. 1E; main effect of treatment and significant interaction  
24 between lesion and treatment  $F_s > 69.46$ ,  $p_s < 0.001$ ).

25

## 1 **Chronic MSDC-0160 treatment normalized mTOR activity and iNOS expression**

2 Previous studies have implicated the mTOR pathway in 6-OHDA-induced neurotoxicity[44],  
3 and MSDC-0160 has been shown to modify its activity [25]. We therefore measured the level  
4 of mTOR expression in the dorsal striatum. We observed that p-mTOR/mTOR ratio was  
5 significantly increased by 139.3 % in 6-OHDA rats compared to sham animals (Fig. 2B; main  
6 effect of lesion:  $F_{1,44} = 3.76$ ,  $p < 0.05$ ). MSDC-0160 treatment in 6-OHDA rats prevented this  
7 increase, but had no significant effect in the sham group (Fig. 2A and 2B; Significant interaction  
8 between lesion and treatment:  $F_{1,44} = 4.76$ ,  $p < 0.03$ ).

9 Because neuroinflammatory processes occur in 6-OHDA-induced neuronal damage in the rat  
10 [36, 45], we also investigated whether MSDC-0160 administration could modulate iNOS  
11 expression in dorsal striatum. We found that MSDC-0160 treatment had no effect in sham  
12 animals (Fig. 2A and 2C; post-hoc test of Tukey adjusted p value  $> 0.91$ ), but completely  
13 circumvented the increase in iNOS level induced by 6-OHDA (Fig.2A and 2C; main effect of  
14 treatment and significant interaction between lesion and treatment:  $F_s > 7.4$ ,  $p_s < 0.009$ ).

15

## 16 **Chronic MSDC-0160 treatment led to metabolic adaptation of glycolysis and the TCA** 17 **cycle**

18 We further investigated the potential influence of MSDC-0160 on metabolic alterations induced  
19 by 6-OHDA lesion. We focused our analysis on key metabolites related to pyruvate metabolism  
20 i.e. glucose, pyruvate and citrate[46]. The expression of the key mitochondrial enzyme pyruvate  
21 dehydrogenase (PDH), which links glycolysis to the TCA cycle by generating acetyl-coA from  
22 pyruvate[20], was also measured in the dorsal striatum and expressed as a ratio of the inactive  
23 phosphorylated form (p-PDH) to total PDH (Fig. 3).

24 Neither the injection of 6-OHDA, nor MSDC-0160 treatment altered the circulating level of  
25 glucose (Fig. 3C;  $p = 0.32$ ). Pyruvate levels were slightly increased in lesioned rats and further

1 increased in 6-OHDA animals that received MSDC-0160 treatment compared to control (Fig.  
2 3D; main effect of lesion  $F_{1,44} = 13.72$ ,  $p < 0.001$ , marginal effect of treatment  $F_{1,44} = 3.15$ ,  $p =$   
3  $0.08$  and marginal interaction between both factors:  $F_{1,44} = 2.98$ ,  $p = 0.09$ ). Finally, we report a  
4 treatment-independent increase in the circulating level of citrate in 6-OHDA animals (Fig.3E,  
5 main effect of lesion  $F_{1,44} = 16.72$ ,  $p < 0.001$ , but not interaction between lesion and treatment  
6  $F_{1,44} = 0.37$   $p = 0.55$ ).  
7 MSDC-0160 treatment alone did not modify the p-PDH/PDH ratio. While a significant 71.5%  
8 increase of this ratio was observed in 6-OHDA rats compared to controls, the ratio was not  
9 affected by MSDC-0160 treatment (Fig. 3B; main effect of lesion  $F_{1,44} = 7.41$   $p = 0.009$  but not  
10 of treatment  $F_{1,44} = 0.0003$   $p = 0.99$ ).

11

12 **Chronic MSDC-0160 treatment modified brain energy supply in 6-OHDA rats:**  
13 **Ketogenesis, beta-oxidation and glutamate oxidation**

14 Our previous study[19], reinforced by the present metabolic analysis, suggested decoupling of  
15 glycolysis from the TCA cycle, and mitochondrial use of alternative sources of energy[19]. We  
16 therefore investigated 3 alternative pathways which can be activated to supply brain energy, i.e.  
17 ketogenesis, beta oxidation and glutamate oxidation, by measuring the key enzymes involved  
18 in their use, namely, acetyl- CoA acetyltransferase 1 (ACAT1)[47], carnitine palmitoyl  
19 transferase 1 (CPT1)[48] and glutamate dehydrogenase (GDH) respectively (Fig. 4E).

20 First, dorso-striatal expression of ACAT1 significantly increased in 6-OHDA animals  
21 compared to shams (Fig. 4A; main effect of lesion  $F_{1,44} = 42.10$ ,  $p < 0.001$ ). Moreover, MSDC-  
22 0160 treatment increased ACAT1 expression in both sham and 6-OHDA animals (Fig. 4A;  
23 main effect of treatment  $F_{1,44} = 18.54$ ,  $p < 0.001$ , without interaction  $F_{1,44} = 0.15$ ,  $p = 0.70$ ).  
24 Concomitantly, the serum levels of the two main ketone bodies, acetoacetate and  $\beta$ -

1 hydroxybutyrate, rose significantly in 6-OHDA animals and were further increased by  
2 treatment with MSDC-0160 (Fig.4F; main effect of lesion and treatment  $F_S > 4.58$ ,  $p_S < 0.03$ ).  
3 Similarly, the expression of CPT1, which catalyzes the rate-limiting step of  $\beta$ -oxidation[48],  
4 significantly rose with 6-OHDA and MSDC-0160 treatment (Fig. 4B, main effect of lesion and  
5 treatment  $F_S > 23.32$ ,  $p_S < 0.001$ ). In parallel, a significant decrease of chain length and  
6 unsaturation of fatty acids (FA) was observed in 6-OHDA animals compared to shams (Fig.  
7 4G, main effect of lesion  $F_S > 9.39$ ,  $p_S < 0.003$  and marginal effect of treatment  $F_S > 2.83$ ,  $p_S <$   
8  $0.09$ ).  
9 Finally, 6-OHDA animals treated with MSDC-0160 presented a significant increase of  
10 glutamate dehydrogenase (GDH), allowing the entry and use of glutamate in the TCA cycle  
11 (Fig. 4C, main effect of lesion and treatment  $F_S > 7.01$ ,  $p_S < 0.01$  and marginal interaction  $F_{1,44}$   
12  $= 3.83$ ;  $p = 0.07$ ).

13

## 14 **Discussion**

15 There is a growing body of evidence showing that targeting the MPC could constitute a  
16 promising approach to find a cure for PD [14, 25, 49]. In the present study, we expanded  
17 previous findings regarding the potential neuroprotective effect of MPC inhibition[25, 35] to  
18 unilateral 6-OHDA rats. This model, which replicates most of the cell processes encountered  
19 in PD[42, 50], represents a phenotypically consistent and standard model of PD. We observed  
20 that chronic MSDC-0160 treatment protects against 6-OHDA-induced SNc denervation and  
21 associated PD-like motor impairments. Additionally, we found that MSDC-0160 normalized  
22 pro-inflammatory and mTOR pathway actors, both impacted by 6-OHDA and implicated in PD  
23 physiopathology. Finally, we highlighted multiple actions of MSDC-0160 treatment on  
24 mitochondria-related metabolic pathways, promoting the use of alternative energy substrates to

1 glycolysis, in particular by accentuating possible compensatory mechanisms such as  
2 ketogenesis that are normally overridden in PD.

3 Collectively, these results improve our understanding of MSDC-0160 neuroprotective  
4 mechanisms and provide the basis for further evaluation of how metabolism reprogramming  
5 might impact the course of PD.

6

7 In the present study, as expected, unilateral injection of 6-OHDA resulted in damage to the  
8 nigrostriatal pathway with significant neurodegeneration in the SNc resulting in denervation of  
9 the striatum[42], and leading to a significant decrease of contralateral forelimb use, which  
10 generally happens after denervation of at least 70 % of the nigrostriatal pathway[51]. Chronic  
11 MSDC-0160 treatment in the 6-OHDA group partially prevented SNc neurodegeneration and  
12 was sufficient to almost completely protect against motor impairment. These findings extend  
13 results from *C.elegans* and mouse models of PD[25, 49] to a PD rat model with another  
14 neurotoxin and therefore further highlight the potential neuroprotective effect of MSDC-0160.

15

16 We have also shown that the neuroprotective effect of MSDC-0160 was associated with  
17 normalization of mTOR activity in 6-OHDA animals. As a key regulator of cell metabolism  
18 and survival, the mTOR signaling pathway, playing a critical role in autophagy, has been found  
19 dysregulated in PD[52, 53] and investigated as a potential therapeutic target[4, 54].  
20 Appealingly, TZDs can modulate mTOR activity, particularly the mTORC1 complex involved  
21 in autophagy [55, 56]. Moreover, it has been shown that autophagic signals could modulate  
22 neuroinflammation[57–59], which is instrumental in neuronal cell death and particularly  
23 involved in the progression of neurodegeneration[9, 60]. Furthermore, neuroinflammatory  
24 processes in PD, induced by released neurotoxic factors such as nitric oxide, are mediated by  
25 iNOS[61, 62]. Well in line with previous studies reporting increase of nitrite levels[61, 63] in

1 6-OHDA animals, we observed a stronger expression of iNOS in untreated lesioned animals,  
2 which was alleviated by MSDC-0160. Consistently, NOS inhibitors have been investigated as  
3 a potential therapeutic strategy in 6-OHDA animals and are shown to protect DA neurons of  
4 the nigrostriatal pathway and reduce the associated motor deficits[61, 64, 65]. Overall, these  
5 results strongly suggest that the MSDC-0160 neuroprotective effect observed in our study may  
6 be achieved through a mTOR modulation and an associated reduction of neuroinflammation.

7  
8 In addition to these mechanisms, global energy failure linked to mitochondrial dysfunction  
9 represents an hallmark of neuronal death in PD[18, 66], and markers of these dysfunctions,  
10 such as inhibition of complex I, have been reported in brain and blood of PD patients[3]. Under  
11 normal physiological conditions, glucose is the dominant exogenous energy substrate in the  
12 brain[46]. It is converted into pyruvate, the master fuel for the TCA cycle in mitochondria[15].  
13 In the present study, neither 6-OHDA nor MSDC-0160 altered blood glucose levels, but blood  
14 pyruvate increased in both 6-OHDA groups. This pyruvate accumulation is consistent with the  
15 increased p-PDH/PDH ratio observed in the lesioned rats since the activity of PDH regulates  
16 entry of pyruvate into the TCA cycle. Abnormally increased levels of pyruvate and decreased  
17 levels of PDH have already been observed in PD models and patients[67, 68]. Moreover, in  
18 rodents, downregulation of PDH was associated with dopaminergic degeneration and could  
19 result in motor impairments similar to those observed in other PD animal models[69]. The  
20 neuroprotective effect of MSDC-0160 was not associated with a reduction of PDH expression  
21 compared to untreated 6-OHDA animals which is consistent with previous studies reporting  
22 that TZDs do not influence PDH activation[70] and that MPC knock-down leads to metabolic  
23 reprogramming distinct from PDH inhibition[24]. Surprisingly, despite diminution of PDH in  
24 6-OHDA animals, limiting the use of pyruvate as fuel[71], citrate, the first metabolite of the



1 TCA cycle, was in fact increased in these animals, suggesting its potential supply from one or  
2 several alternative sources[72].  
3 Among them, ketone bodies represent one of the main alternative fuels for the brain (see fig  
4 4E). Produced by oxidation of fatty acid in the liver, ketones bodies, such as beta-  
5 hydroxybutyrate (BHB) and acetoacetate, are transported by blood and are able to cross the  
6 blood–brain barrier to produce acetyl-CoA thus supplying the TCA cycle. In the present study,  
7 we have shown that MSDC-0160 treatment increased the blood levels of BHB and acetoacetate  
8 in sham animals, and even further increased them in lesioned animals. These observations were  
9 reinforced by MSDC-0160-dependent upregulation of ACAT1, the pivotal enzyme of  
10 ketogenesis[47, 73]. Interestingly, increased ketogenesis has been previously studied in the PD  
11 context and, as in our experiments, has been shown to alleviate motor dysfunction, reduce  
12 neuronal loss in the SNc and down-regulate neuroinflammation[74, 75]. Moreover, recent  
13 studies highlighted crucial roles for ketone bodies in cell metabolism, in particular in the  
14 maintenance of energy production in condition such as MPC inhibition[24, 27]. Furthermore,  
15 a ketogenic diet has been shown to prevent the lethality induced by MPC knock-out in mice[23].  
16 Finally, substitution of glucose by ketone bodies inactivates PDH[76–78] and might also  
17 indirectly affect pyruvate utilization by competing for entry into mitochondria, which could  
18 explain our result associated with pyruvate metabolism[72, 79].  
19 Concomitantly, the decrease of mean chain length and mean unsaturation of fatty acids that we  
20 observed in blood of 6-OHDA animals treated with MSDC-0160 suggests an increase of  $\beta$ -  
21 oxidation[80], consistent with the increase of ketone bodies. These results are supported by  
22 brain expression of CPT1, catalyzing the rate-limiting step of  $\beta$ -oxidation[48], which appeared  
23 increased by 6-OHDA and even more by MSDC-0160 treatment. Appealingly, CPT1 can be  
24 modulated by TZDs[56]. Moreover, variation in fatty acid chain lengths, possibly maintaining  
25 acetyl-CoA synthesis and therefore energy homeostasis, have also been observed in other

1 animal models of PD[81]. Finally, CPT1 can promote human mesenchymal stem cell survival  
2 under glucose deprivation through an enhanced availability of fatty acids as fuel substrates for  
3 ATP generation[82].

4 In addition to these alternative sources, we have shown that MSDC-0160 increased the  
5 expression of glutamate dehydrogenase (GDH), which was even further increased in the 6-  
6 OHDA-lesioned rats, supporting the possibility of glutamate utilization for cell metabolism  
7 under MPC inhibition. Indeed, GDH allows glutamate to supply the TCA cycle by the  
8 formation of  $\alpha$ -ketoglutarate. When the glucose supply is sufficient, and energy status adequate  
9 to cell needs, this pathway is less active. However, when energy demand is increased, as in the  
10 context of PD pathology, GDH activity is increased[83] in order to support the anaplerotic  
11 needs of the cell[27, 49]. Moreover, this switching to glutamate oxidation may reduce the  
12 glutamate pool and therefore excitotoxic neuronal death[27, 49, 84], contributing to the  
13 neuroprotective effects of MPC inhibition.

14 In summary, our results reveal that in unilateral PD rats, the neuroprotective effect of MSDC-  
15 0160 treatment includes several distinct mechanisms which appear to be upstream of metabolic  
16 reprogramming. Indeed, as already described, MSDC-0160 treatment can correct mechanisms  
17 related to neuronal death such as autophagy and neuroinflammation. Moreover, our results  
18 strongly suggest that the effect of MSDC-0160 treatment could be seen as a reprogramming of  
19 energy production inside the brain. Indeed, we demonstrated that MSDC-0160 treatment  
20 increased the use of alternative substrates to supply the energy needs in the PD context and to  
21 try to maintain energy homeostasis[84–86]. Compared with targeting a single pathway, such as  
22 the ketogenic diet, which improves PD symptomatology[78, 87] but seems difficult to foresee  
23 in the long term[88], this multi-mechanism action, leading to global reorganization of cell  
24 metabolism, appears preferable. Notably, the present study highlights that MPC can be targeted

1 by clinically safe drugs such as MSDC-0160 and shows promising effects that could provide a  
2 useful treatment for PD.

3

4

## 5 **Conclusion**

6 This study contributes to a clearer understanding of the potential of MSDC-0160 as a  
7 neuroprotective treatment, by reprogramming metabolism through inhibition of the MPC.  
8 Although much remains to be learned about the underlying mechanisms, the translational  
9 potential of MPC inhibition for the treatment of PD is strongly supported by these findings.

10

## 11 **Abbreviations**

12 6-OHDA: 6-hydroxydopamine; DS: Dorsal striatum; mTOR: Mammalian target of rapamycin;  
13 MPC: Mitochondrial pyruvate carrier; MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine;  
14 NMR: Nuclear magnetic resonance; PD: Parkinson's disease; SNc: Substantia nigra pars  
15 compacta; TCA: Tricarboxylic acid; TH-IR: Tyrosine hydroxylase immunoreactivity; TZD:  
16 thiazolidinedione

17

## 18 **Supplementary Information**

19 **Additional file 1. Fig. S1:** Location of cannula implantations within the SNc in the different  
20 groups.

21

## 22 **Acknowledgement**

23 The authors would like to thank Adrien Favier and Alicia Vallet from IBS (Grenoble) for  
24 technical assistance concerning NMR experiments and IR-RMN-THC Fr3050 CNRS for

1 financial support for conducting the research. They also thank Magali Bartolomucci for her  
2 technical help regarding cylinder test experiment.

3

#### 4 **Declaration**

##### 5 **Author contributions**

6 Research: D.M, R.G, J.C, S.C, E.L.B, S.B, F.F

7 Conducted experiments: D.M, R.G

8 Designed research: D.M, S.B, F.F, J.C

9 Analysed data D.M, S.B, F.F

10 Wrote the manuscript D.M, S.B, F.F with the help of the other authors

11

#### 12 **Funding**

13 This work was supported by ANR, DOPALCOMP, Fondation de France (grant#00086205), the

14 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Grenoble Alpes University.

15 IRMaGe is partly funded by the French program Investissement d’Avenir run by the French

16 National Research Agency, grant Infrastructure d’avenir en Biologie Sante [ANR-11-INBS-

17 0006]. This project was partly funded by NeuroCoG IDEX UGA in the framework of the

18 Investissements d’avenir program [ANR-15-IDEX-02].

19

#### 20 **Availability of data and materials**

21 All data generated or analyzed during this study are included in this article and supplementary

22 information files.

#### 23 **Ethic approval and consent to participate**

1 All protocols complied with the European Union 2010 Animal Welfare Act and the French  
2 directive 2010/63 and were approved by the French national ethics committee (2013/113) n°  
3 004 and by local ethical committee C2EA84.

4

#### 5 **Consent for publication**

6 Not applicable

7

#### 8 **Competing interests**

9 The authors declare that there is no conflict of interest

10

#### 11 **References**

- 12 1. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, et al (2017) Parkinson disease. Nature Reviews  
13 Disease Primers. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- 14 2. Nicoletti V, Palermo G, Del Prete E, et al (2021) Understanding the Multiple Role of  
15 Mitochondria in Parkinson's Disease and Related Disorders: Lesson From Genetics  
16 and Protein–Interaction Network. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*
- 17 3. Camilleri A, Vassallo N (2014) The Centrality of mitochondria in the pathogenesis and  
18 treatment of Parkinson's disease. *CNS Neuroscience and Therapeutics*
- 19 4. Bové J, Martínez-Vicente M, Vila M (2011) Fighting neurodegeneration with  
20 rapamycin: Mechanistic insights. *Nature Reviews Neuroscience*
- 21 5. Tansey MG, Goldberg MS (2010) Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role  
22 in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiology of*  
23 *Disease*
- 24 6. Roca-Agujetas V, De Dios C, Lestón L, et al (2019) Recent Insights into the  
25 Mitochondrial Role in Autophagy and Its Regulation by Oxidative Stress. *Oxidative*  
26 *Medicine and Cellular Longevity*
- 27 7. Zheng X, Boyer L, Jin M, et al (2016) Alleviation of neuronal energy deficiency by  
28 mtor inhibition as a treatment for mitochondria-related neurodegeneration. *eLife*.  
29 <https://doi.org/10.7554/eLife.13378>
- 30 8. Brown GC, Bal-Price A (2003) Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric  
31 Oxide, Glutamate, and Mitochondria. *Molecular Neurobiology*
- 32 9. Di Filippo M, Chiasserini D, Tozzi A, et al (2010) Mitochondria and the link between  
33 neuroinflammation and neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*
- 34 10. Athauda D, Foltynie T (2015) The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in  
35 Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*
- 36 11. Kalia L V., Kalia SK, Lang AE (2015) Disease-modifying strategies for Parkinson's  
37 disease. *Movement Disorders*
- 38 12. Olanow CW, Kieburtz K, Schapira AH v (2008) Why have we failed to achieve  
39 neuroprotection in Parkinson's disease? *Annals of Neurology* 64

- 1 13. Rey F, Ottolenghi S, Giallongo T, et al (2021) Mitochondrial metabolism as target of  
2 the neuroprotective role of erythropoietin in Parkinson's disease. *Antioxidants*.  
3 <https://doi.org/10.3390/antiox10010121>
- 4 14. Quansah E, Peelaerts W, Langston JW, et al (2018) Targeting energy metabolism via  
5 the mitochondrial pyruvate carrier as a novel approach to attenuate neurodegeneration.  
6 *Molecular Neurodegeneration*
- 7 15. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB (2014) Regulation of pyruvate metabolism and  
8 human disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*
- 9 16. Martínez-Reyes I, Chandel NS (2020) Mitochondrial TCA cycle metabolites control  
10 physiology and disease. *Nature Communications*
- 11 17. Ahmed SS, Santosh W, Kumar S, Christlet HTT (2009) Metabolic profiling of  
12 Parkinson's disease: Evidence of biomarker from gene expression analysis and rapid  
13 neural network detection. *Journal of Biomedical Science*. [https://doi.org/10.1186/1423-](https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-63)  
14 [0127-16-63](https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-63)
- 15 18. Anandhan A, Jacome MS, Lei S, et al (2017) Metabolic Dysfunction in Parkinson's  
16 Disease: Bioenergetics, Redox Homeostasis and Central Carbon Metabolism. *Brain*  
17 *Research Bulletin*
- 18 19. Mallet D, Dufourd T, Decourt M, et al (2021) Early diagnosis of Parkinson's disease:  
19 A cross-species biomarker. *bioRxiv* 2021.10.04.462993.  
20 <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.462993>
- 21 20. Zangari J, Petrelli F, Maillot B, Martinou JC (2020) The multifaceted pyruvate  
22 metabolism: Role of the mitochondrial pyruvate carrier. *Biomolecules*.  
23 <https://doi.org/10.3390/biom10071068>
- 24 21. Buchanan JL, Taylor EB (2020) Mitochondrial pyruvate carrier function in health and  
25 disease across the lifespan. *Biomolecules*
- 26 22. Bender T, Martinou JC (2016) The mitochondrial pyruvate carrier in health and  
27 disease: To carry or not to carry? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell*  
28 *Research*
- 29 23. Vanderperre B, Herzig S, Krznar P, et al (2016) Embryonic Lethality of Mitochondrial  
30 Pyruvate Carrier 1 Deficient Mouse Can Be Rescued by a Ketogenic Diet. *PLoS*  
31 *Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006056>
- 32 24. Vacanti NM, Divakaruni AS, Green CR, et al (2014) Regulation of substrate utilization  
33 by the mitochondrial pyruvate carrier. *Molecular Cell* 56:425–435.  
34 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.024>
- 35 25. Ghosh A, Tyson T, George S, et al (2016) Mitochondrial pyruvate carrier regulates  
36 autophagy, inflammation, and neurodegeneration in experimental models of  
37 Parkinson's disease. *Science Translational Medicine* 8:.  
38 <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag2210>
- 39 26. Divakaruni AS, Wiley SE, Rogers GW, et al (2013) Thiazolidinediones are acute,  
40 specific inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier. *Proceedings of the National*  
41 *Academy of Sciences of the United States of America*.  
42 <https://doi.org/10.1073/pnas.1303360110>
- 43 27. Divakaruni AS, Wallace M, Buren C, et al (2017) Inhibition of the mitochondrial  
44 pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death. *Journal of Cell Biology*.  
45 <https://doi.org/10.1083/jcb.201612067>
- 46 28. Brauer R, Bhaskaran K, Chaturvedi N, et al (2015) Glitazone treatment and incidence  
47 of parkinson's disease among people with diabetes: A retrospective cohort study. *PLoS*  
48 *Medicine*. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001854>

- 1 29. Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A (2017) The 6-  
2 hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older  
3 model. *Neurología (English Edition)*. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.06.019>
- 4 30. Wachter B, Schürger S, Rolinger J, et al (2010) Effect of 6-hydroxydopamine (6-  
5 OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: Evidence for de-  
6 differentiation of resident astrocytes. *Cell and Tissue Research*.  
7 <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1061-x>
- 8 31. Haas SJP, Zhou X, Machado V, et al (2016) Expression of *tgfb1* and inflammatory  
9 markers in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Frontiers in*  
10 *Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00007>
- 11 32. Druj G, Carnicella S, Carcenac C, et al (2014) Loss of dopaminergic nigrostriatal  
12 neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease.  
13 *Molecular psychiatry* 19:358–67. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.3>
- 14 33. Favier M, Duran T, Carcenac C, et al (2014) Pramipexole reverses Parkinson's disease-  
15 related motivational deficits in rats. *Movement Disorders* 29:912–920.  
16 <https://doi.org/10.1002/mds.25837>
- 17 34. Paxinos G, Watson C (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic  
18 Press, San Diego 3rd:
- 19 35. Peelaerts W, Bergkvist L, George S, et al (2020) Inhibiting the mitochondrial pyruvate  
20 carrier does not ameliorate synucleinopathy in the absence of inflammation or  
21 metabolic deficits. *bioRxiv*
- 22 36. Rentsch P, Stayte S, Morris GP, Vissel B (2019) Time dependent degeneration of the  
23 nigrostriatal tract in mice with 6-OHDA lesioned medial forebrain bundle and the  
24 effect of activin A on l-Dopa induced dyskinesia. *BMC Neuroscience*.  
25 <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0487-7>
- 26 37. Magno LA, Collodetti M, Tenza-Ferrer H, Romano-Silva M (2019) Cylinder Test to  
27 Assess Sensory-Motor Function in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *BIO-*  
28 *PROTOCOL*. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3337>
- 29 38. Butler TAJ, Paul JW, Chan EC, et al (2019) Misleading westerns: Common  
30 quantification mistakes in western blot densitometry and proposed corrective measures.  
31 *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2019/5214821>
- 32 39. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, et al (2007) Metabolic profiling, metabolomic  
33 and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue  
34 extracts. *Nat Protoc* 2:2692–2703. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>
- 35 40. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, et al (2018) HMDB 4.0: The human metabolome  
36 database for 2018. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- 37 41. Zancanaro C, Nano R, Marchioro C, et al (1994) Magnetic resonance spectroscopy  
38 investigations of brown adipose tissue and isolated brown adipocytes. *Journal of Lipid*  
39 *Research*. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)39925-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)39925-9)
- 40 42. Magnard R, Vachez Y, Carcenac C, et al (2016) What can rodent models tell us about  
41 apathy and associated neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease? *Transl*  
42 *Psychiatry* 6:e753. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.17>
- 43 43. Schwarting RKW, Huston JP (1996) Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-  
44 striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Progress in Neurobiology*
- 45 44. He X, Yuan W, Li Z, Feng J (2017) An autophagic mechanism is involved in the 6-  
46 hydroxydopamine-induced neurotoxicity in vivo. *Toxicology Letters* 280:29–40.  
47 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.08.006>
- 48 45. Walsh S, Finn DP, Dowd E (2011) Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and  
49 neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion



- 1 models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience*.
- 2 <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.005>
- 3 46. Diemel GA (2019) Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function.
- 4 *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017>
- 5 47. Abdelkrem E, Harijan RK, Yamaguchi S, et al (2019) Mutation update on ACAT1
- 6 variants associated with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency.
- 7 *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.23831>
- 8 48. Wolfgang MJ, Kurama T, Dai Y, et al (2006) The brain-specific carnitine
- 9 palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proceedings of the National*
- 10 *Academy of Sciences of the United States of America*.
- 11 <https://doi.org/10.1073/pnas.0602205103>
- 12 49. Tang BL (2019) Targeting the mitochondrial pyruvate carrier for neuroprotection.
- 13 *Brain Sciences*
- 14 50. Hernandez-Baltazar D, Nadella R, Rovirosa-Hernandez M de J, et al (2018) Animal
- 15 Model of Parkinson Disease: Neuroinflammation and Apoptosis in the 6-
- 16 Hydroxydopamine-Induced Model. In: *Experimental Animal Models of Human*
- 17 *Diseases - An Effective Therapeutic Strategy*
- 18 51. Schwarting RKW, Huston JP (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model
- 19 in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments.
- 20 *Progress in Neurobiology*
- 21 52. Malagelada C, Ryu EJ, Biswas SC, et al (2006) RTP801 is elevated in Parkinson brain
- 22 substantia nigral neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease
- 23 by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. *Journal of*
- 24 *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3292-06.2006>
- 25 53. Lan A ping, Chen J, Zhao Y, et al (2017) mTOR Signaling in Parkinson's Disease.
- 26 *NeuroMolecular Medicine*
- 27 54. Zhu Z, Yang C, Iyaswamy A, et al (2019) Balancing mTOR signaling and autophagy
- 28 in the treatment of Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*
- 29 55. Colca JR (2015) The TZD insulin sensitizer clue provides a new route into diabetes
- 30 drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*
- 31 56. Colca JR, McDonald WG, Kletzien RF (2014) Mitochondrial target of
- 32 thiazolidinediones. *Diabetes, Obesity and Metabolism*
- 33 57. Palavra F, Ambrósio AF, Reis F (2016) mTOR and Neuroinflammation. In: *Molecules*
- 34 *to Medicine with mTOR: Translating Critical Pathways into Novel Therapeutic*
- 35 *Strategies*
- 36 58. Zheng HF, Yang YP, Hu LF, et al (2013) Autophagic Impairment Contributes to
- 37 Systemic Inflammation-Induced Dopaminergic Neuron Loss in the Midbrain. *PLoS*
- 38 *ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070472>
- 39 59. Cho KS, Lee JH, Cho J, et al (2018) Autophagy Modulators and Neuroinflammation.
- 40 *Current Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181031144605>
- 41 60. Hirsch EC, Vyas S, Hunot S (2012) Neuroinflammation in Parkinson's disease.
- 42 *Parkinsonism and Related Disorders*. [https://doi.org/10.1016/s1353-8020\(11\)70065-7](https://doi.org/10.1016/s1353-8020(11)70065-7)
- 43 61. Singh S, Kumar S, Dikshit M (2010) Involvement of the mitochondrial apoptotic
- 44 pathway and nitric oxide synthase in dopaminergic neuronal death induced by 6-
- 45 hydroxydopamine and lipopolysaccharide. *Redox Report*.
- 46 <https://doi.org/10.1179/174329210X12650506623447>
- 47 62. Hunot S, Boissière F, Faucheux B, et al (1996) Nitric oxide synthase and neuronal
- 48 vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00578-1)
- 49 [4522\(95\)00578-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00578-1)



- 1 63. Di Matteo V, Pierucci M, Benigno A, et al (2009) Involvement of nitric oxide in  
2 nigrostriatal dopaminergic system degeneration: A neurochemical study. In: Annals of  
3 the New York Academy of Sciences
- 4 64. Singh S, Das T, Ravindran A, et al (2005) Involvement of nitric oxide in  
5 neurodegeneration: A study on the experimental models of Parkinson's disease. Redox  
6 Report. <https://doi.org/10.1179/135100005X38842>
- 7 65. Li M, Dai FR, Du XP, et al (2012) Neuroprotection by silencing iNOS expression in a  
8 6-OHDA model of Parkinson's disease. Journal of Molecular Neuroscience.  
9 <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9814-5>
- 10 66. Pathak D, Berthet A, Nakamura K (2013) Energy failure: Does it contribute to  
11 neurodegeneration? Annals of Neurology. <https://doi.org/10.1002/ana.24014>
- 12 67. Ahmed SSSJ, Santosh W, Kumar S, Christlet HTT (2009) Metabolic profiling of  
13 Parkinson's disease: evidence of biomarker from gene expression analysis and rapid  
14 neural network detection. JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE 16:.  
15 <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-63>
- 16 68. Henchcliffe C, Shungu DC, Mao X, et al (2008) Multinuclear magnetic resonance  
17 spectroscopy for in vivo assessment of mitochondrial dysfunction in Parkinson's  
18 disease. In: Annals of the New York Academy of Sciences
- 19 69. Ojano-Dirain C, Glushakova LG, Zhong L, et al (2010) An animal model of PDH  
20 deficiency using AAV8-siRNA vector-mediated knockdown of pyruvate  
21 dehydrogenase E1 $\alpha$ . Molecular Genetics and Metabolism 101:183–191.  
22 <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.07.008>
- 23 70. Shannon CE, Daniele G, Galindo C, et al (2017) Pioglitazone inhibits mitochondrial  
24 pyruvate metabolism and glucose production in hepatocytes. FEBS Journal.  
25 <https://doi.org/10.1111/febs.13992>
- 26 71. Patel MS, Nemeria NS, Furey W, Jordan F (2014) The pyruvate dehydrogenase  
27 complexes: Structure-based function and regulation. Journal of Biological Chemistry
- 28 72. Roberts EL (2007) The support of energy metabolism in the central nervous system  
29 with substrates other than glucose. In: Handbook of Neurochemistry and Molecular  
30 Neurobiology: Brain Energetics. Integration of Molecular and Cellular Processes
- 31 73. Rose J, Brian C, Pappa A, et al (2020) Mitochondrial Metabolism in Astrocytes  
32 Regulates Brain Bioenergetics, Neurotransmission and Redox Balance. Frontiers in  
33 Neuroscience
- 34 74. Tieu K, Perier C, Caspersen C, et al (2003) D- $\beta$ -Hydroxybutyrate rescues  
35 mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. Journal of  
36 Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI200318797>
- 37 75. Yang X, Cheng B (2010) Neuroprotective and anti-inflammatory activities of  
38 ketogenic diet on MPTP-induced neurotoxicity. Journal of Molecular Neuroscience.  
39 <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9336-y>
- 40 76. Reed LJ (1981) Regulation of Mammalian Pyruvate Dehydrogenase Complex by a  
41 Phosphorylation–Dephosphorylation Cycle. In: Current Topics in Cellular Regulation
- 42 77. Patel MS, Korotchikina LG (2003) The biochemistry of the pyruvate dehydrogenase  
43 complex. Biochemistry and Molecular Biology Education
- 44 78. Puchalska P, Crawford PA (2017) Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel  
45 Metabolism, Signaling, and Therapeutics. Cell Metabolism
- 46 79. Booth RFG, Clark JB (1981) Energy Metabolism in Rat Brain: Inhibition of Pyruvate  
47 Decarboxylation by 3-Hydroxybutyrate in Neonatal Mitochondria. Journal of  
48 Neurochemistry. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1981.tb05306.x>
- 49 80. Chance DS, McIntosh MK (1994) Rates of beta-oxidation of fatty acids of various  
50 chain lengths and degrees of unsaturation in highly purified peroxisomes isolated from

- 1 rat liver. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*  
2 [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90011-6)
- 3 81. Worth AJ, Basu SS, Snyder NW, et al (2014) Inhibition of neuronal cell mitochondrial  
4 complex i with rotenone increases lipid  $\beta$ -oxidation, supporting acetyl-coenzyme a  
5 levels. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.591354>
- 6 82. Roa-Mansergas X, Fadó R, Atari M, et al (2018) CPT1C promotes human  
7 mesenchymal stem cells survival under glucose deprivation through the modulation of  
8 autophagy. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25485-7>
- 9 83. Zaganas I V., Kanavouras K, Borompokas N, et al (2014) The odyssey of a young  
10 gene: Structure-function studies in human glutamate dehydrogenases reveal  
11 evolutionary-acquired complex allosteric regulation mechanisms. *Neurochemical*  
12 *Research*
- 13 84. Kim AY, Baik EJ (2019) Glutamate Dehydrogenase as a Neuroprotective Target  
14 Against Neurodegeneration. *Neurochemical Research*. [https://doi.org/10.1007/s11064-](https://doi.org/10.1007/s11064-018-2467-1)  
15 [018-2467-1](https://doi.org/10.1007/s11064-018-2467-1)
- 16 85. Greco T, Glenn TC, Hovda DA, Prins ML (2016) Ketogenic diet decreases oxidative  
17 stress and improves mitochondrial respiratory complex activity. *Journal of Cerebral*  
18 *Blood Flow and Metabolism*. <https://doi.org/10.1177/0271678X15610584>
- 19 86. Rojas-Morales P, Pedraza-Chaverri J, Tapia E (2020) Ketone bodies, stress response,  
20 and redox homeostasis. *Redox Biology*
- 21 87. Brietzke E, Mansur RB, Subramaniapillai M, et al (2018) Ketogenic diet as a metabolic  
22 therapy for mood disorders: Evidence and developments. *Neuroscience and*  
23 *Biobehavioral Reviews*
- 24 88. Włodarek D (2019) Role of ketogenic diets in neurodegenerative diseases (Alzheimer's  
25 disease and parkinson's disease). *Nutrients*
- 26  
27

28

29

30

31

32

33

34

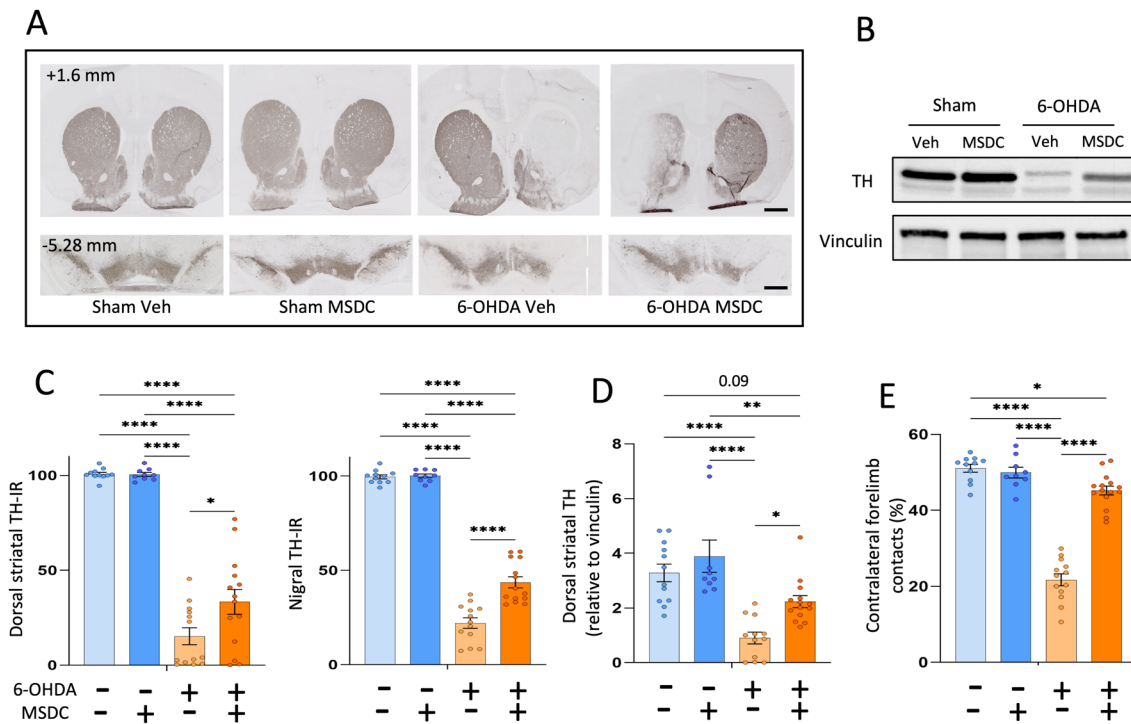
35

36

37

38

1 **Figures**



2

3 **Fig. 1: Treatment with MSDC-0160 induced neuroprotection in unilateral 6-OHDA PD**

4 **rats.** (A) Example of representative immunohistochemistry for TH in dorsal striatum (upper

5 panel) and substantia nigra pars compacta (lower panel) in sham and 6-OHDA rats, with or

6 without MSDC-0160 (AP: +1.6 mm and -5.28 mm relative to bregma). Scale bars represent 2

7 mm. (B) Representative western blots illustrating the level of TH in the dorsal striatum of sham

8 and 6-OHDA rats, treated or not with MSDC. (C) Quantification of TH-IR staining loss at the

9 dorso-striatal (left bar graph) and the nigral (right bar graph) levels, expressed as a percentage

10 of the mean value obtained for the contralateral side. (D) Bar graph showing mean density of

11 western blot TH/vinculin ratio in the dorsal striatum. (E) Bar graph showing contralateral

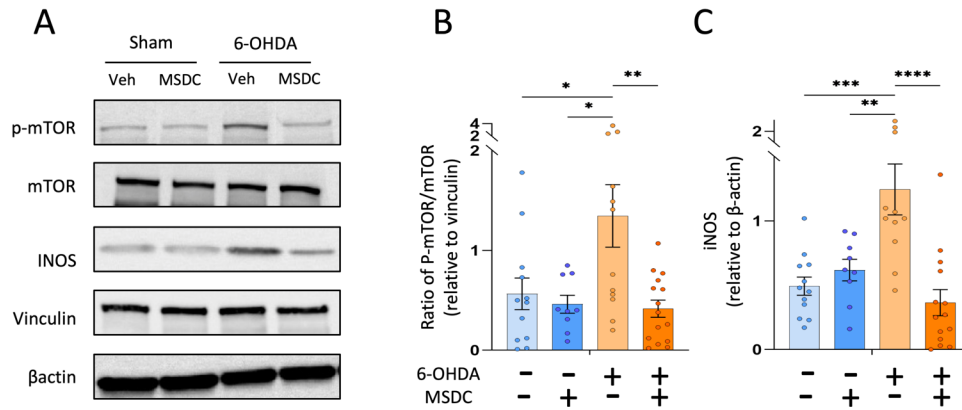
12 forelimb contacts in the cylinder test expressed as a percentage of ipsilateral forelimb contacts.

13 Mean  $\pm$  SEM, Two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test and correction for multiple

14 comparisons \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$

15

16



1

2 **Fig. 2: Chronic MSDC-0160 treatment normalized mTOR activity and iNOS expression.**

3 (A) Representative western blots illustrating the expression of p-mTOR (Ser<sup>2448</sup>), mTOR, iNOS,

4 vinculin and β-actin in the dorsal striatum of sham and 6-OHDA rats with or without MSDC-

5 0160. (B) Bar graphs showing mean western blot p-mTOR/mTOR ratios relative to vinculin in

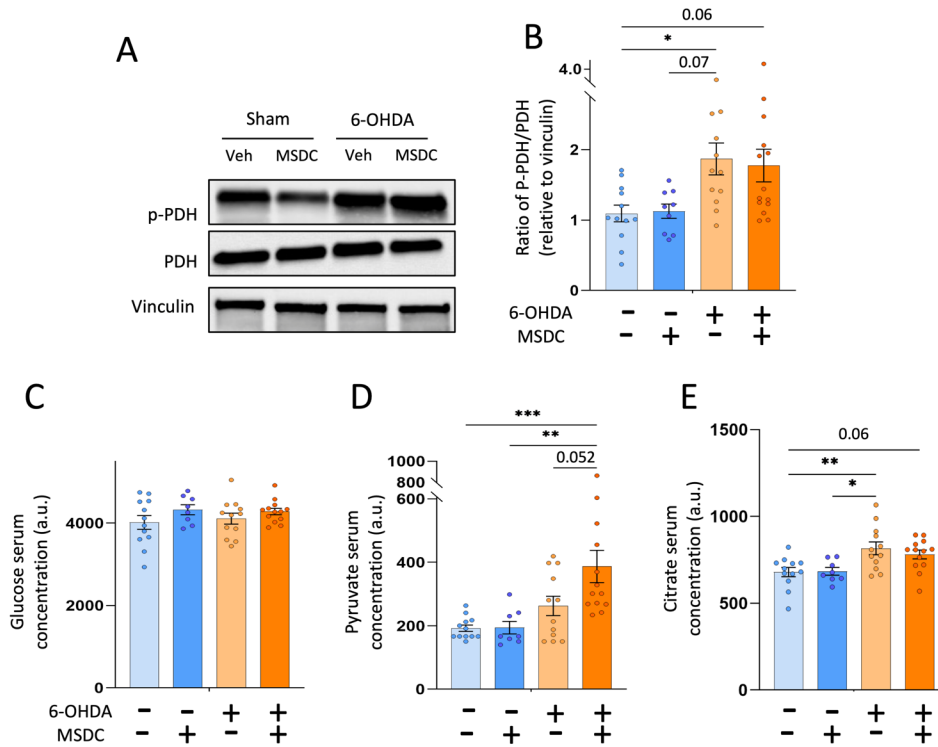
6 the dorsal striatum. (C) Bar graphs showing mean western blot iNOS levels relative to β-actin

7 in the dorsal striatum. Mean ± SEM, Two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test and

8 correction for multiple comparisons \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$

9

10



1

2 **Fig. 3: Chronic MSDC-0160 treatment led to metabolic adaptation of glycolysis and the**

3 **TCA cycle.** (A) Representative western blots illustrating the expression of p-PDH (Ser<sup>293</sup>), PDH

4 and vinculin in the dorsal striatum of sham and 6-OHDA rats, with or without MSDC-0160.

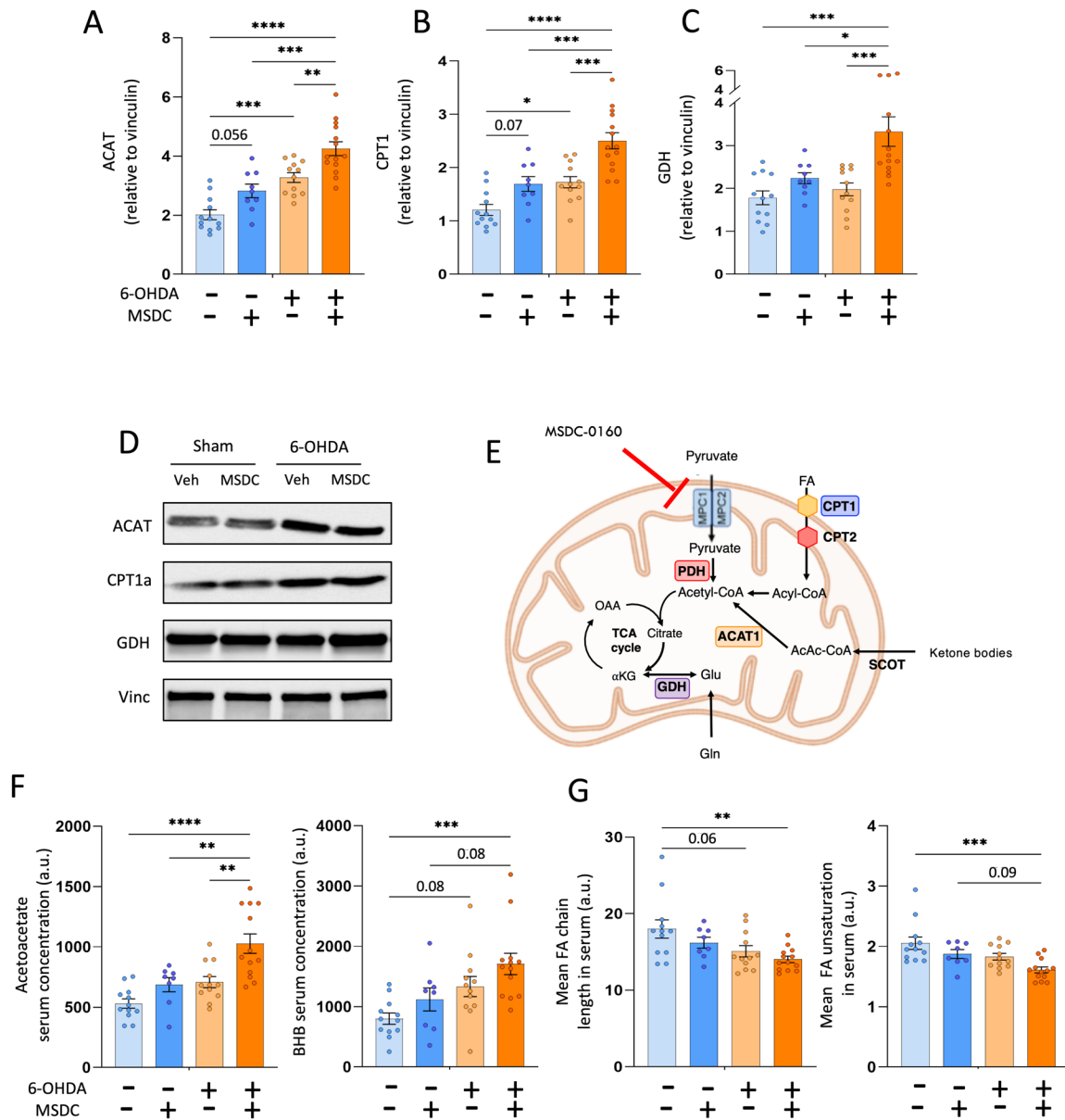
5 (B) Bar graphs showing mean western blot p-PDH/PDH ratio relative to vinculin in dorsal

6 striatum. (C-E) Relative serum levels of glucose (C), pyruvate (D) and citrate (E).

7 Mean ± SEM, Two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test and correction for multiple

8 comparisons \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$

9



1

2

**Fig. 4: Chronic MSDC-016 treatment modified brain energy supply in 6-OHDA rats:**

3

**Ketogenesis, beta-oxidation and glutamate oxidation (A-C)** Bar graphs showing mean

4

western blots for ACAT (A), CPT1 (B) and GDH (C), relative to vinculin in the dorsal striatum.

5

(D) Representative western blots illustrating the expression of ACAT, CPT1 and GDH in the

6

dorsal striatum. (E) Schematic diagram summarizing alternative energy sources pathways and

7

their principal actors potentially enhanced by MPC blockage. (F) Relative amplitude of serum

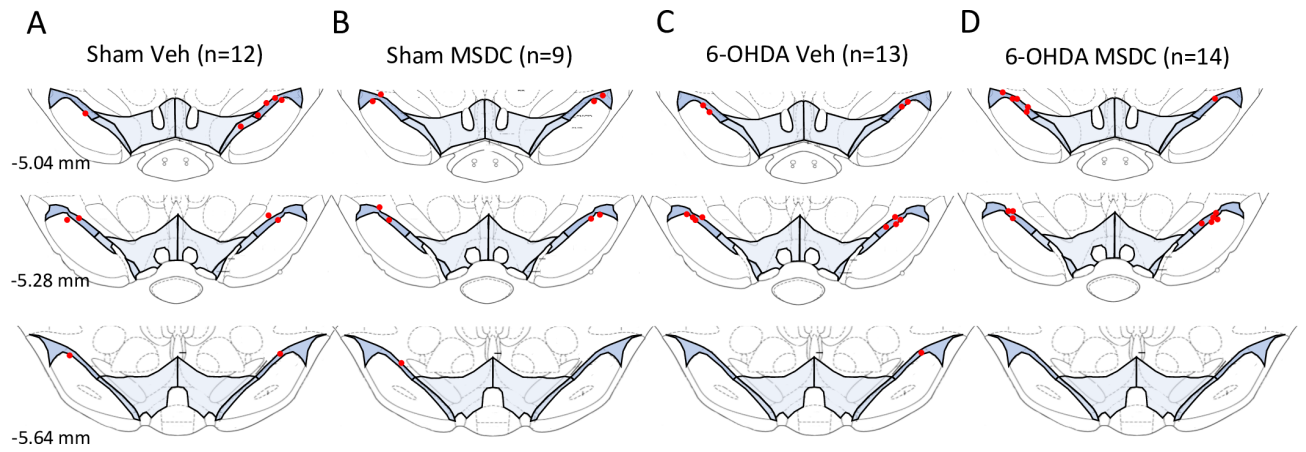
8

ketone body metabolites usable as energetic fuel. (G) Fatty acid chain length and unsaturation,

9

associated with beta oxidation. Mean  $\pm$  SEM, Two-way ANOVA followed by Tukey's post-

- 1 hoc test and correction for multiple comparisons \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:
- 2  $p \leq 0.0001$ . *BHB*: Beta-hydroxybutyrate, *Gln*: Glutamine, *Glu*: Glutamate, *AcAc-Coa*: acetoacetyl Coenzyme
- 3 *A*, *FA*: Fatty acid, *OAA*: oxaloacetate,  *$\alpha$ -KG*: alpha-Ketoglutarate. *SCOT*: 3-ketoacid Coenzyme A transferase.
- 4



**Figure S1: Location of canula implantations within the SNc among different groups studied**

Sham animals that received NaCl 0.9% treated with placebo (A) or MSDC-0160 (B). Lesioned animals that received  $3\mu\text{l}$  of 6-OHDA ( $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) treated with placebo (C) or MSDC-0160 (D).





# Discussion

L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de ce travail doctoral, portant sur l'étude des dérégulations métaboliques associées aux différentes phases de la MP, a contribué à mieux comprendre l'étiologie de la MP, à la détecter plus précocement et enfin, à plus long terme, à envisager de nouvelles pistes thérapeutiques à visée curative.

Tout d'abord, à partir d'échantillons de sérum de 3 différents modèles animaux, nous avons mis en évidence des dérégulations métaboliques, et ceci dès la phase prodromale de la MP, *i.e.* avant l'apparition de symptômes moteurs. Nous avons ensuite confronté ces résultats à ceux issus de l'analyse d'échantillons de sérum de patients. Cela nous a permis de ne retenir que les métabolites qui étaient communs à au moins 3 des 4 groupes étudiés. Grâce à cette démarche, nous avons développé un biomarqueur, basé sur une combinaison spécifique de 6 métabolites, permettant de distinguer avec une grande précision les sujets atteints de la MP des sujets contrôles, chez l'animal et chez l'homme. De plus, ce biomarqueur permettant de discriminer les animaux prodromaux des contrôles, nous avons émis l'hypothèse qu'il devrait permettre de prédire le développement de la MP chez les patients prodromaux.

L'ensemble de ces dérégulations sériques, associé à des expériences de métabolomique sur tissu, suggérait fortement l'implication de dérégulations du métabolisme énergétique, et plus particulièrement un découplage entre la glycolyse et le cycle TCA au niveau mitochondrial, dans la physiopathologie de la maladie. Afin d'explorer la possibilité d'un lien causal entre ces dérégulations et la physiopathologie de la MP, nous avons bloqué le transporteur mitochondrial du pyruvate (MPC), mimant ainsi un découplage entre glycolyse et cycle TCA. Cette approche, mise en place chez le rat hémi-parkinsonien, a entraîné une modulation du métabolisme énergétique ayant des effets neuroprotecteurs au niveau cellulaire et conduisant à une amélioration sur le plan comportemental.

## A. Biomarqueur diagnostique de la MP : Défis actuels et perspectives futures

Le diagnostic trop tardif de la MP constitue l'un des freins majeurs pour le développement de traitement curatif et nécessite donc d'être amélioré. En effet, malgré le développement récent de nouvelles approches (voir Chapitre 1 page 36) et la standardisation des outils utilisés, le diagnostic reste cantonné aux phases cliniques et ne permet pas une détection de la MP dès les premiers stades, ce qui limite fortement le développement de

traitement à visée curative. De plus, comme le diagnostic est basé sur des symptômes cliniques qui peuvent être communs à d'autres affections neurologiques, il est peu performant pour différencier ces différentes pathologies et notamment les différents syndromes de type parkinsonien. Par conséquent, le diagnostic reste sous-optimal, même lorsque la maladie se manifeste cliniquement (Rajput & Rajput, 2014). Afin d'essayer de répondre à ces différents challenges, la recherche de biomarqueur a conduit au développement d'outils issus de différents domaines tels que la génétique, l'imagerie ou la biochimie. Ainsi, trouver un biomarqueur, défini selon la FDA et le NIH comme « une caractéristique mesurée objectivement et évaluée comme indicateur de processus physiologique ou pathologique, ou de l'action des médicaments », pourrait contribuer à une amélioration du diagnostic de la MP et ainsi à une amélioration de la prise en charge des patients.

### 1. Biomarqueur de la phase prodromale

La phase prodromale de la MP, où le processus neurodégénératif n'a pas encore atteint 50% dans la SNc, apparaît comme la période idéale pour appliquer des thérapies à visée curative tout en optimisant leurs chances de succès (Tolosa et al., 2007, 2021). Difficilement accessibles chez l'homme, les phases précoces sont principalement étudiées par le biais de modèles animaux (Taguchi et al., 2020). Ainsi, plusieurs modèles ont été utilisés dans le cadre d'étude métabolomique dans le but de développer un biomarqueur de la MP. Notamment, un modèle progressif se basant sur l'injection de PFF chez la souris a permis de développer un biomarqueur sanguin discriminant dès la phase prodromale de la MP (Graham et al., 2018). De plus, chez la souris, des injections de différentes doses de MPTP permettant de mimer différentes phases de la MP, ont permis de mettre en évidence des dérégulations sanguines spécifiquement associées à la phase prodromale (A. Kim et al., 2019). De façon intéressante, certaines de ces dérégulations telle qu'une diminution du glutamate et une agmentation de glycine ont également été retrouvées chez le patient parkinsonien. Cette démarche innovante, qui permet d'étudier les différentes phases de la pathologie chez l'animal, et de transposer les résultats obtenus à l'étude de la phase clinique chez le patient parkinsonien, se confronte néanmoins aux limites du modèle animal utilisé (voir chapitre 2 page 42), qui ne résume pas l'ensemble de la physiopathologie de la maladie et pourrait donc n'exprimer que les dérégulations métaboliques liées aux processus induits par le MPTP.

Lors de notre approche translationnelle, afin de pallier à ces limitations, nous avons croisé les résultats issus de différents modèles animaux complémentaires, permettant de couvrir une plus large partie du spectre des différentes phases de la MP et de leurs caractéristiques anatomo-pathologiques (Bezard et al., 1998; Bezard & Przedborski, 2011).

Ainsi, l'utilisation du modèle rat 6-OHDA, nous a permis de mimer les processus de dénervation dopaminergique retrouvés dans les différentes phases de la MP et leurs symptômes associés. Cependant, l'utilisation de ce modèle s'affranchit du caractère progressif de la maladie puisque la dénervation induite par la 6-OHDA permet de mimer un stade donné (en fonction du niveau de dénervation) et reste stable au sein d'un même animal (Rentsch et al., 2019). Des processus similaires ont pu être mimés dans le modèle primate non-humain traité au MPTP, chez une espèce plus proche de l'homme d'un point de vue neuroanatomique et symptomatologique, renforçant notre démarche translationnelle (Choudhury & Daadi, 2018; Emborg, 2007; Villalba et al., 2009). Dans notre étude, les primates non-humains ont suivi un protocole d'intoxication aiguë au MPTP, qui a conduit au développement rapide de la pathologie. Ainsi, les prélèvements de sang à l'état sain ont été comparés uniquement à ceux réalisés à la fin du protocole correspondant à des stades avancés de la MP.

Cependant, ces modèles ne reproduisent pas l'entièreté de la physiopathologie de la MP, et notamment, ils ne présentent pas de corps de Lewy (Bezard et al., 1998). Ainsi, afin de pallier cette limitation, nous avons complété notre étude par l'utilisation d'un modèle de rat alpha-synucléine. Ce modèle est basé sur l'infusion, directement au sein de la SNc, d'un vecteur viral codant pour l'alpha-synucléine humaine mutée conduisant progressivement, après plusieurs semaines, à l'accumulation d'alpha-synucléine et à la formation de corps de Lewy (Decressac et al., 2012). Bien que ce modèle puisse conduire à une dégénérescence dopaminergique hétérogène en fonction des animaux (Chesselet et al., 2008; Potashkin et al., 2011), qui ne conduit pas systématiquement à l'apparition des symptômes caractéristiques de la phase prodromale de la MP, son évolution progressive permet de suivre les différentes phases de la MP au sein d'un même animal (Bourdenx et al., 2015; Dehay & Fernagut, 2016).

Au-delà d'une bonne reproduction de la physiopathologie de la MP, il est intéressant de noter que ces trois modèles animaux présentent des déficits mitochondriaux semblables à ceux rencontrés chez les patients parkinsoniens, notamment au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale limitant ainsi la production d'ATP (Blum et al., 2001; J.-H. Park et al., 2020; Schober, 2004; Vicario et al., 2018). Ainsi, la comparaison croisée des dérégulations

métaboliques observées dans ces 3 modèles a permis de s'affranchir des modifications spécifiques à un modèle particulier ou aux mécanismes physiopathologiques uniquement présents dans celui-ci.

Cependant, il serait intéressant de compléter notre étude avec des modèles animaux à développement plus lent, ce qui permettrait de mieux caractériser les modifications métaboliques associées à l'évolution de la pathologie. Par exemple, chez le primate non-humain, des expositions chroniques plus éloignées les unes des autres permettraient d'avoir accès à la phase prodromale, pendant laquelle les animaux présentent des symptômes non-moteurs semblables à ceux observés chez l'homme, comme par exemple des troubles du sommeil. Ces derniers sont en effet peu étudiés chez le rongeur, malgré leur prévalence allant jusqu'à 70% chez les patients parkinsoniens (Diaconu et al., 2021; Emborg, 2007; Seo et al., 2019). Aussi, les modèles basés sur l'inoculation de PFF chez le rat, qui présentent un développement très lent de la dégénérescence dopaminergique associée à l'accumulation de corps de Lewy, pourraient constituer un modèle supplémentaire intéressant qui permettrait d'explorer d'autres pistes physiopathologiques (Polinski, 2021). En effet, cela permettrait de se rapprocher de l'hypothèse de Braak sur le développement de la pathologie puisque l'inoculation de PFF peut être réalisée à l'extérieur du cerveau tout en entraînant un syndrome de type parkinsonien (S. Kim et al., 2019; Polinski, 2021).

## 2. Défis méthodologiques pour faciliter l'accès à des biomarqueurs sensibles en clinique

### *a. Choix de l'échantillon*

Initialement, le LCR a été privilégié pour la recherche de biomarqueurs de maladies neurodégénératives, notamment de la MP (Shao & Le, 2019), car il est un reflet direct du système nerveux central. Néanmoins, l'accès au LCR se fait de manière invasive, par ponction lombaire, ce qui rend la répétabilité difficile et limite son utilisation en routine pour le développement d'un biomarqueur.

Ainsi, d'autres types de biofluides, facilement accessible et de manière répétée, ont été étudiés tels que l'urine ou la salive, couramment utilisées en métabolomique, permettant le développement de biomarqueur ayant une précision allant jusqu'à 95% (Kumari et al., 2020;

Luan et al., 2015). Cependant, ces échantillons présentent une stabilité du métabolome moins importante que le sang, ce qui rend ainsi leur utilisation moins fiable (Stevens et al., 2019). De façon plus surprenante, d'autres types d'échantillons tels que le liquide lacrymal ou le sébum ont récemment été étudiés pour le diagnostic de la MP et, bien qu'ils restent inférieurs aux résultats des études se basant sur les échantillons de sang, ils montrent des résultats encourageants avec une spécificité entre 66 et 87% (Bogdanov et al., 2021; Sinclair et al., 2021).

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé le sérum, biofluide facilement accessible à partir du sang. De plus, les dérégulations sanguines peuvent également refléter des mécanismes centraux impliqués dans la MP tels que les mécanismes énergétiques (Smith et al., 2018; VITTE et al., 2004).

Ainsi, le sérum apparaît comme un biofluide de choix dans le cadre de la recherche de biomarqueur. Ces observations sont d'ailleurs en accord avec les travaux de Braak qui ont montré que la MP touche à la fois le système nerveux central mais également le système nerveux périphérique dès les phases précoces de la maladie (Braak et al., 2003), ce qui pourrait entraîner des dérégulations détectables dans des échantillons systémiques comme le sérum.

De plus, le sérum est d'autant plus intéressant qu'il présente une composition en métabolites très similaire entre les différentes espèces, ce qui facilite également la démarche de transposition entre modèle préclinique et clinique. Néanmoins, leur concentration variable d'une espèce à l'autre, notamment entre homme et animal, doit être prise en compte (Bertolone et al., 2020; Blais et al., 2017; Leenaars et al., 2019; Martignoni et al., 2006). En effet, nous avons observé des différences importantes dans notre première étude entre les échantillons humains et animaux dans la concentration des métabolites, ce qui nous a conduit à les traiter de manière indépendante. Aussi, il est nécessaire de suivre rigoureusement le même protocole dans la préparation des échantillons. Ainsi, pour faciliter l'utilisation de ce type d'échantillon, nous avons pris le parti de travailler avec des échantillons bruts afin de minimiser le nombre d'étapes de préparation et les biais potentiels associés à chacune d'entre elles (Beckonert et al., 2007). Cela nous a permis de développer un biomarqueur ayant une précision importante pour le diagnostic de la MP avec notamment une bonne sensibilité pour l'ensemble des différents modèles animaux (85%), qui est encore meilleure pour les patients (95%).

### *b. La métabolomique par RMN*

L'utilisation de la métabolomique en routine nécessite des instruments analytiques qui sont pour le moment peu présents en clinique ou réservés à d'autres types d'analyses (e.g. la SM pour l'analyse des protéines). Malgré sa robustesse, sa reproductibilité et le peu de préparation des échantillons qu'elle nécessite, la RMN n'échappe pas à ce constat. Cependant, la RMN à haut débit avec l'automatisation de différentes étapes, allant de la préparation des tubes de sérum, à leur insertion dans l'aimant et à l'analyse RMN, est en train de se développer. C'est notamment ce que propose le nouveau système dénommé IVD<sub>r</sub> (In Vitro Diagnostic research), développé par Bruker, qui permet l'analyse de tout type de biofluide humain de façon automatique. Ainsi, cette approche permet une analyse métabolomique automatisée en routine, ce qui est indispensable pour une application clinique. Ce type d'instrument qui vise à démocratiser la métabolomique par RMN en clinique (Rizzo et al., 2016) commence à être installé à l'hôpital (Paris - 2019) et vient d'arriver au CHU de Grenoble (fin 2021). Ce dispositif est développé uniquement pour un champ de 600MHz, alors que nos analyses ont été effectuées à plus haut champ (950MHz). Le fait d'utiliser un champ plus bas pourrait limiter notre capacité à détecter certains métabolites bien qu'ils soient fortement concentrés dans le sérum (Yu et al., 2011)(A.-H. M. Emwas, 2015b). Cela devra donc être évalué pour faciliter sa transposition vers la clinique.

D'autre part, l'harmonisation du workflow des études métabolomiques représente le point central pour le transfert de méthodes et de résultats entre modèles précliniques et cliniques (Drucker & Krapfenbauer, 2013; Letertre, Giraudeau, et al., 2021). En effet, outre le champ magnétique utilisé, l'homogénéisation du type d'échantillon utilisé et des protocoles expérimentaux pour leur collecte et leur préparation est primordiale. Par exemple, dans notre étude, nous avons procédé à une mise à jeun des animaux avant d'effectuer le prélèvement sanguin, permettant de minimiser l'effet de l'alimentation sur les niveaux des métabolites. À l'inverse, certains échantillons humains, notamment pour la cohorte NIH de l'étude 1, n'ont pas été prélevés à la suite d'une mise à jeun. En effet, celle-ci n'est pas toujours possible à mettre en place chez le patient. Bien qu'aucune valeur aberrante n'ait été observée pour ces patients en particulier, la question de la nécessité d'une mise à jeun ou non pour l'utilisation



de notre biomarqueur reste importante, d'autant plus qu'il intègre la valeur des niveaux des corps cétoniques qui peuvent grandement être impactés par l'alimentation (N. J. Jensen et al., 2020). Bien que les effets de l'alimentation sur le profil métabolique apparaissent comme contradictoire en fonction des études (Floegel et al., 2013; Menni et al., 2013; Rezzi et al., 2007; Sedlmeier et al., 2018), il semblerait que la mise à jeun permette une meilleure stabilité de l'ensemble des métabolites sériques dans l'échantillon à court terme (Sedlmeier et al., 2018), mais également à long terme, ce qui est crucial dans le cadre de durée de congélation supérieure à 2 ans, pour la mise en place de biobanques par exemple (Carayol et al., 2015).

Ce manque de consensus entre les études limite l'émergence de la métabolomique en clinique dans le cadre des maladies neurodégénératives.

Dans le futur, une harmonisation du workflow pourra notamment passer par le biais de l'automatisation, comme dans le système IVDr, permettant une analyse robuste, rapide et sans besoin d'expertise en RMN. Ce type d'approche nécessiterait néanmoins l'introduction et la démocratisation de la RMN en clinique, qui reste pour le moment limitée. A plus court terme, bien qu'il se limite à seulement quelques métabolites, le développement de kits enzymatiques pourrait représenter une méthode d'utilisation plus simple et démocratisée que la RMN.

### 3. Biomarqueur sanguin et diagnostic différentiel de la MP

Au-delà de sa détermination tardive et de sa sensibilité, le diagnostic de la MP est également limité par la différenciation de la MP par rapport aux maladies neurodégénératives confondantes telles que la MSA ou la PSP. En effet, les symptômes moteurs typiques de la MP comme l'akinésie et la rigidité, sur lesquels est basé le diagnostic, peuvent également être présents dans la MSA et la PSP respectivement, entraînant des erreurs de diagnostic dans environ 20% des cas (Koga et al., 2015b; Levin et al., 2016; Miki et al., 2021b; Pouclet et al., 2012). Bien que des approches d'imagerie, comme l'IRM, permettent de confirmer ce diagnostic différentiel, leur utilisation se limite à plusieurs années après le début de la maladie, car elles sont peu sensibles aux phases précoces (Mitchell et al., 2021). Au final, le diagnostic différentiel peut prendre plusieurs années et nécessite le suivi des patients afin de détecter d'éventuels critères d'exclusion pour la MP.

Ainsi, la spécificité du diagnostic, notamment vis à vis de ces maladies confondantes, représente donc un enjeu important à prendre en compte pour le développement d'un biomarqueur de la MP. C'est pourquoi notre biomarqueur devra être confronté à d'autres types d'affections neurodégénératives afin d'évaluer sa spécificité, au regard des maladies confondantes comme la MSA et la PSP, mais aussi d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. En effet, à ce stade, on ne peut exclure que notre biomarqueur ne reflète pas uniquement le processus neurodégénératif présent dans tous les modèles animaux et chez les patients de notre étude. Néanmoins, le fait qu'il ait très récemment été montré que l'on pouvait différencier des patients MP, PSP et MSA sur la base de la détection de métabolites plasmatiques identiques aux nôtres (Pathan et al., 2021), comme le beta-hydroxybutyrate et la valine, mais aussi d'autres métabolites comme la taurine, le formate ou l'arginine, apparaît très encourageant pour l'application de notre biomarqueur au diagnostic différentiel. De plus, comparé à l'étude citée ci-dessus, notre biomarqueur est plus avancé dans sa caractérisation, promet d'être performant dès la phase prodromale et ne nécessite pas plusieurs étapes pour son analyse, comme notamment l'extraction des métabolites pour la SM, ce qui devrait faciliter son utilisation en clinique.

L'approche métabolomique sur des biofluides facilement accessibles pourrait se positionner en appui, voir même en amont des méthodes d'imageries actuelles, permettant ainsi un diagnostic à la fois précoce (métabolomique) de manière non invasive, et différentiel par des examens complémentaires (IRM). Dans ce sens une étude récente a rapporté que l'utilisation conjointe de la métabolomique sur des échantillons sanguins et de la TEP permettrait d'améliorer la performance intrinsèque de chacune de ces 2 approches passant d'une précision d'environ 80% à plus de 90% pour le diagnostic de la MP (Glaab et al., 2019).

## B. Modification du métabolisme énergétique associé à MP

Au-delà de l'aspect diagnostic, la prise en charge de la MP est limitée par une connaissance encore incomplète de son étiologie. La métabolomique, qui apporte une vision plus globale du métabolisme, pourrait permettre d'améliorer cette connaissance. Ainsi, l'analyse concomitante d'échantillons de sérum et de tissu striatal nous a permis de proposer plusieurs hypothèses quant aux mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la maladie.

## 1. Hypothèse de dérégulation métabolique : Découplage de la glycolyse et du cycle TCA

Compte tenu de l'implication centrale de la production d'énergie dans la MP, nos observations nous ont amené à émettre l'hypothèse qu'il existerait un découplage entre la glycolyse et le cycle TCA. En effet, les niveaux sanguins de glucose, qui est le principal substrat utilisé par le cerveau, et les métabolites du cycle TCA, n'étaient modifiés ni dans les modèles animaux étudiés ni chez les patients. A l'inverse, nous avons constaté une augmentation des métabolites associés à la glycolyse, et notamment le pyruvate, ainsi que certains corps cétoniques (Mallet et al., 2021). Ces observations suggèrent fortement qu'un blocage entre la glycolyse et le cycle TCA, entraînant potentiellement un manque de production d'énergie, pourrait être compensé par d'autres voies métaboliques comme la surproduction de corps cétoniques.

Cette hypothèse est en accord avec les données de la littérature plaçant la mitochondrie comme un acteur central dans le métabolisme de la MP (Anandhan, Jacome, et al., 2017; Camilleri & Vassallo, 2014; di Filippo et al., 2010; Mizuno et al., 1995; Murali Mahadevan et al., 2021). Cependant, dans les modèles animaux 6-OHDA et MPTP, ces observations ont été faites après l'induction du syndrome parkinsonien via des neurotoxines agissant directement sur la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Blum et al., 2001; Schober, 2004). Ainsi, elles peuvent refléter à la fois des dérégulations entraînées par l'induction de la pathologie, mais aussi des mécanismes induisant la mort cellulaire, ou encore des mécanismes compensatoires mis en place pour limiter l'effet des neurotoxines. Par exemple, une augmentation des corps cétoniques a été relevée dans les modèles MPTP et 6-OHDA qui sont tous deux associés à un dysfonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Or, il a été montré qu'au-delà d'être une source potentielle d'acétyl-Coa, les corps cétoniques pourraient agir dans la chaîne de respiration mitochondriale via des mécanismes dépendant du complexe 2 et donc, dans ce cas, pourraient refléter l'apparition d'un mécanisme compensatoire (Tieu et al., 2003). De manière similaire, une augmentation des niveaux de lactate ou de pyruvate pourrait être à l'origine d'une acidification du cytosol pouvant activer les mécanismes responsables de l'autophagie, protectrice dans des modèles MPTP (Fedotova et al., 2021).

La jonction entre glycolyse et cycle TCA fait intervenir différents acteurs enzymatiques à savoir le MPC, la PDH et, dans une moindre mesure, la pyruvate carboxylase (PC). Le blocage ou l'inhibition de ces cibles dans différentes études *in vitro* et *in vivo* a conduit à des dérégulations métaboliques semblables à celles observées dans nos différents modèles et nous a donc conduit à émettre des hypothèses concernant le MPC et la PDH, que nous avons explorées par la suite.

## 2. Implication du MPC dans la MP : Effet neuroprotecteur de son blocage

L'intérêt d'un blocage du MPC dans le cadre de la MP émerge d'observations réalisées chez des patients souffrant d'autres pathologies. En effet, une diminution de la prévalence de la MP a été observée chez des patients traités avec des sensibilisateurs à l'insuline qui entraînent un blocage du MPC, par rapport à d'autres traitements (Brauer et al., 2015; Colca, 2015). De plus, dans un modèle de souris MPTP, le blocage de ce transporteur a permis une amélioration des affections motrices, associée à une diminution de la dénervation dopaminergique (Ghosh et al., 2016). De manière similaire, lors de nos travaux, le blocage du MPC a été associé à une diminution de la dénervation chez les animaux 6-OHDA ainsi qu'à une amélioration des affections motrices.

Au niveau métabolique, le blocage du MPC chez la souris ou dans des cultures de neurones, de manière pharmacologique ou virale, a conduit à des dérégulations similaires à celles que nous avons observées lors de notre étude 1, à savoir, une augmentation des concentrations de pyruvate et de lactate, associée à des niveaux inchangés des métabolites du cycle TCA. (Divakaruni et al., 2017; Quansah et al., 2018; Vacanti et al., 2014).

Dans le cadre de notre étude, le blocage du MPC a entraîné une augmentation de l'expression de l'acetyl-CoA Acetyltransférase, de la carnitine palmitoyltransférase et de la glutamate déshydrogénase, qui sont des enzymes respectivement impliquées dans la cétolyse, la beta oxydation ainsi que dans l'utilisation du glutamate. De manière intéressante, ces augmentations ont été encore plus importantes chez les animaux 6-OHDA, illustrant un possible renforcement des mécanismes compensatoires mis en place pour limiter la perte énergétique (Dienel, 2019; Roberts, 2007).

Le blocage du MPC semble en effet conduire à une réponse simultanée de plusieurs voies métaboliques, qui ont déjà été testées individuellement comme stratégie de prise en

charge de la MP. Notamment, la mise en place de différents régimes alimentaires cétogènes, riches en graisses, faibles en protéines et en glucides, conduisant ainsi à la production et l'utilisation accrue des corps cétoniques, a montré des effets neuroprotecteurs associés à une amélioration motrice dans des modèles rongeurs MPTP et 6-OHDA (N. J. Jensen et al., 2020; Puchalska & Crawford, 2017; X. Yang & Cheng, 2010). De plus, le blocage du MPC *in vitro*, couplé à l'administration de métabolites marqués, a mis en évidence une utilisation accrue du glutamate pour le maintien des besoins énergétiques, limitant ainsi son stockage et ses effets excitotoxiques (Divakaruni et al., 2017). Cependant, ce type de supplémentation semble difficile à envisager sur le long terme, à l'image des régimes cétogènes qui nécessitent des changements drastiques dans les habitudes alimentaires difficiles à maintenir indéfiniment (Włodarek, 2019). De plus, ne viser qu'une seule cible semble avoir des effets limités et il apparaît désormais que le traitement optimal de la MP reposerait sur le ciblage simultané de plusieurs cibles (Calabresi & di Filippo, 2015). Ainsi, le blocage du MPC pourrait représenter une stratégie plus prometteuse dans le cadre de la prise en charge de la MP.

Cependant, dans nos travaux, et à l'instar de la littérature (Ghosh et al., 2016; Tang, 2019), les animaux ont été traités en amont de l'infusion de la 6-OHDA, ce qui interroge sur l'application de ce genre de stratégie en clinique, une fois la maladie déjà bien installée. Des expériences réalisées dans un modèle génétique souris de la MP par Ghosh et collaborateurs semblent apporter quelques éléments de réponse. En effet, dans ces expériences, le MSDC-0160 a été administré sur des animaux âgés de 3 ou 8 semaines, correspondant respectivement à un stade léger ou un stade modéré de la pathologie. Dans les deux cas, une amélioration des capacités motrices des animaux 24 et 48 semaines après traitement a été observée (Ghosh et al., 2016). Cependant, l'utilisation de la même molécule dans des modèles progressifs surexprimant l'alpha-synucléine via une stratégie virale ou par l'inoculation de PFF, n'a pas conduit à de telles améliorations (Peelaerts et al., 2020). Une des explications probables de cette absence d'effet pourrait être l'absence de lien entre l'agrégation de l'alpha-synucléine et le MPC. En effet, le blocage du MPC, au-delà d'entraîner une redirection du métabolisme énergétique, serait plus efficace contre des processus de types inflammatoire et autophagique, comme démontré dans notre étude et dans d'autres modèles (Divakaruni et al., 2013; Ghosh et al., 2016; Quansah et al., 2018).

De plus, l'administration du MSDC-0160 par voie orale, dans notre étude mais également dans l'ensemble de la littérature *in vivo* dans le cadre de la MP, questionne sur la

spécificité de son action compte tenu de la distribution ubiquitaire des mitochondries dans l'organisme. Ayant mesuré l'expression des enzymes dans le striatum dorsal uniquement, nous ne pouvons exclure que ces modifications puissent aussi être présentes dans tout l'organisme et qu'elles conduisent à des effets autres que cérébraux, comme précédemment rapporté, tels que l'apparition de risques cardiovasculaires ou l'accumulation d'adiposité avec l'utilisation d'autre TZDs (Divakaruni et al., 2013).

D'autre part, dans notre étude, nous n'avons pas différencié les dérégulations associées aux astrocytes et neurones. Or, la spécialisation métabolique en fonction du type cellulaire est maintenant bien connue. Dans ce sens, une étude récente a montré que la réponse énergétique suite à un phénomène de dégénérescence pourrait être majoritairement astrocytaire (Kuter et al., 2018). De plus, parmi les sources énergétiques alternatives utilisées, il a été démontré que les astrocytes avaient une plus grande capacité à oxyder les acides gras que les neurones, et, plus largement, pourraient agir comme des régulateurs du métabolisme énergétique cérébral (Fecher et al., 2019; Rose et al., 2020; Vamecq et al., 2007). Ainsi, un blocage spécifique du MPC au sein des astrocytes, par l'intermédiaire d'AAV par exemple, pourrait représenter une stratégie plus spécifique et possiblement plus efficace, mais plus délicate à mettre en œuvre chez le patient.

En conclusion, notre étude a mis en évidence des actions multiples du composé MSDC-0160, qui a conduit à une redirection du métabolisme énergétique au niveau du striatum dorsal entraînant l'atténuation de certains marqueurs neurobiologiques et symptomatiques de la MP. Ces effets protecteurs pourraient notamment être dûs au maintien d'un niveau énergétique suffisant pour permettre le bon fonctionnement de la mitochondrie. Ces hypothèses sont renforcées par des approches similaires à celles que nous avons utilisées, qui ont montré que le blocage pharmacologique du MPC *in vitro* entraînait une augmentation des niveaux d'acétyl-Coa, premier substrat du cycle TCA pour la formation d'ATP, notamment à partir de sources énergétiques alternatives au glucose (Divakaruni et al., 2017; Quansah et al., 2018; Tang, 2019).

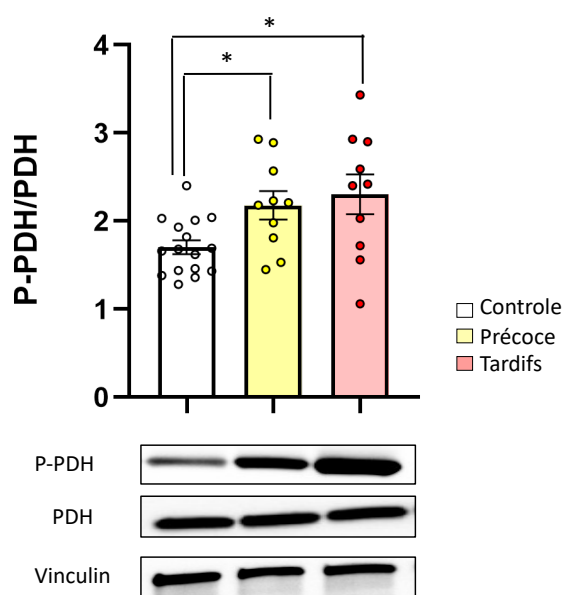
De plus, le maintien d'un niveau énergétique suffisant via d'autres sources que le glucose pourrait se faire sans pour autant augmenter le niveau de ROS (Anandhan, Jacome, et al., 2017), ce qui pourrait participer aux effets neuroprotecteurs que nous avons observés (Dias et al., 2013b; T. Y. Kim et al., 2020).

### 3. Implication de la PDH dans la physiopathologie de la MP

Nos observations métaboliques nous ont conduit à nous intéresser à une autre enzyme clef du métabolisme du pyruvate : la PDH, dont le déficit pourrait expliquer en partie les phénotypes parkinsoniens. En effet, les formes congénitales du déficit de la PDH s'accompagnent d'une altération des aptitudes motrices comme s'asseoir ou marcher. Cette observation est encore renforcée par une étude ayant montré qu'une inhibition de la PDH induite par vecteur viral chez des souris entraîne le même type de troubles moteurs que ceux rencontrés dans la MP, associés à une dégénérescence dopaminergique au niveau de la SNc (Ojano-Dirain et al., 2010). De plus, une diminution des niveaux de PDH a également été associée à des troubles non moteurs semblables à ceux retrouvés dans la phase prodromale de la MP telle que la dépression dans un modèle rat (Detka et al., 2015).

Cette baisse d'activité pourrait notamment faire suite à l'accumulation des corps cétoniques qui sont connus pour exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la PDH (Roberts, 2007).

Afin d'étudier le lien entre la PDH et nos résultats métaboliques, nous avons montré, dans des expériences préliminaires de westernblot réalisées sur les échantillons de striatum collectés dans l'étude 1 et l'étude 2, que le ratio PDH phosphorylée (forme inactive) sur forme totale augmentait (Figure 20 et Figure 3 du manuscrit). Cela suggère une réduction de l'activité de la PDH chez ces animaux.



**Figure 20 : Expression moyenne du rapport P-PDH/PDH par westernblot dans le striatum dorsal des animaux 6-OHDA de l'étude 1.**

Ces résultats sont en accord avec des analyses histologiques post-mortem de cerveaux de patients atteints de la MP, qui montrent une diminution de l'expression de la PDH au niveau de la SNc et du putamen (striatum) (Miki et al., 2017), ainsi qu'avec des analyses génomiques rapportant une diminution du gène de la PDH dans le sang des patients (Ahmed et al., 2009).

Ainsi, nos résultats préliminaires suggèrent qu'un dysfonctionnement de la PDH pourrait être associé à la physiopathologie de la MP, en accord avec la littérature. Bien que dépendante de la quantité de pyruvate présent dans la mitochondrie et dont l'entrée est régulée par le MPC, la diminution de l'activité de la PDH semble avoir des effets opposés au blocage du transporteur mitochondrial sur la dénervation. Néanmoins, nos observations, qui ont montré que le traitement au MSDC-0160 n'entraînait aucune modification du rapport P-PDH/PDH, quelle que soit la condition, contrôle ou 6-OHDA, suggèrent que le niveau d'activité de la PDH ne serait pas dépendant du blocage du MPC. Cette absence de lien entre le blocage du MPC et l'inhibition de la PDH a aussi été observé dans d'autres types cellulaires (muscle et cellule d'hépatocarcinome) après inhibition génétique et pharmacologique du MPC (Vacanti et al., 2014). De plus, chez un patient souffrant d'une mutation génétique entraînant l'inactivation du MPC, l'activité de la PDH mesurée au niveau de fibroblastes et des lymphocytes s'est révélée normale (Gray et al., 2014). Ainsi, même s'il est difficile d'extrapoler ces résultats aux cellules neuronales, ils suggèrent, couplés à nos observations, que la régulation de la PDH pourrait être indépendante de l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie contrôlée par le MPC. Il n'est cependant pas possible actuellement de conclure sur cette hypothèse sur la seule base de nos travaux.

Enfin, afin de mieux comprendre le rôle de la PDH et son potentiel thérapeutique dans la MP, des analyses plus spécifiques seraient nécessaires. En effet, tout comme pour le MPC, l'augmentation du rapport P-PDH/PDH que nous avons observé dans le striatum est globale et ne permet donc pas de différencier la part neuronale ou astrocytaire, or dans ces deux types cellulaires la PDH a une activité différente. En effet, en condition physiologique, la PDH a une activité presque maximale dans les neurones, notamment pour permettre la phosphorylation oxydative, alors qu'elle est très peu utilisée par les astrocytes, qui forment plutôt du lactate comme source de carburant potentiel pour les neurones (Jha et al., 2016). Ainsi, la PDH joue un rôle important dans le passage entre un métabolisme oxydatif et anaérobie. Dans le cadre d'un ciblage thérapeutique, une augmentation de l'activité de la



PDH serait possiblement plus envisageable au niveau astrocytaire où elle est sous utilisée par rapport aux neurones (Halim et al., 2010; Kuter et al., 2018). L'utilisation du pyruvate astrocytaire pourrait ainsi permettre une diminution de la concentration de lactate, comme observé suite à l'inhibition de la kinase inhibitrice de la PDH dans des cultures d'astrocytes. En effet, même s'il peut être utilisé comme carburant pour les neurones, une trop forte concentration en lactate pourrait jouer un rôle majeur dans le développement de troubles neurologiques (S. Park et al., 2018). De plus, en condition de stress métabolique intense, comme dans le cas de la MP, des mécanismes astrocytaires pourraient compenser un dysfonctionnement neuronal via une augmentation de la navette glutamine/glutamate qui peut alimenter le cycle TCA au niveau neuronal (Jha et al., 2016; S. Park et al., 2018). Ce type de reprogrammation, observé dans un modèle souris déficient en PDH (Marin-Valencia et al., 2012), serait d'ailleurs à l'origine de l'atténuation de ROS dans d'autres troubles neurologiques (Jha et al., 2016; S. Park et al., 2018). Ainsi, des expériences supplémentaires pour distinguer ces dérégulations de manière plus spécifique pourraient potentiellement permettre d'optimiser la stratégie thérapeutique entre mécanismes astrocytaires et neuronaux (Halim et al., 2010; Kuter et al., 2018).

#### 4. La mitochondrie organite central dans l'approche thérapeutique de la MP ?

L'ensemble de nos résultats nous a conduit à privilégier le métabolisme du pyruvate, et plus particulièrement le lien entre glycolyse et cycle TCA, comme un acteur majeur de la physiopathologie de la MP, plaçant le MPC et la PDH comme des cibles thérapeutiques prometteuses. L'intérêt principal de ces cibles repose sur leur rôle central au sein du métabolisme énergétique et surtout sur leur capacité d'actions multiples, entraînant une redistribution du métabolisme plus globale et notamment au niveau énergétique.

La mitochondrie, siège du métabolisme oxydatif, apparaît comme un organite central dans le métabolisme énergétique cellulaire et le maintien de son homéostasie représente un enjeu essentiel dans le cadre des approches thérapeutiques de la MP.

Ainsi pour pallier au déficit du métabolisme oxydatif observé dans la MP, une approche reposant sur l'induction de la biogenèse mitochondriale, via l'activation des récepteurs aux

proliférateurs peroxysomaux (PPAR), un groupe de facteurs de transcription régissant une multitude de fonctions cellulaires, dont le métabolisme mitochondrial et l'homéostasie énergétique, a été proposée (Scarpulla, 2011). De façon intéressante, il a été montré que les TZDs tel que le MSDC-0160 activent les récepteurs des PPAR et conduisent ainsi à l'augmentation de la biogenèse mitochondriale, ainsi qu'au maintien de l'activité de la chaîne respiratoire. Bien que nous n'ayons pas observé l'état des mitochondries dans notre étude, ce phénomène pourrait expliquer une partie des effets neuroprotecteurs que nous avons observés (Divakaruni et al., 2017; Fujisawa et al., 2009).

Le bon fonctionnement mitochondrial repose également sur son état d'oxydation et la production de ROS. Dans la MP, le blocage ou le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire va entraîner une sur-activation de la glycolyse et du cycle TCA, afin de pallier à ce déficit, et donc conduire à une accumulation importante de ROS (Anandhan, Jacome, et al., 2017). Cette accumulation est d'autant plus nocive que la quantité d'enzymes responsables de leur dégradation diminue avec la MP (Weng et al., 2018). L'utilisation de molécules anti-oxydantes seules n'a pas permis d'améliorer les symptômes associés à la MP (voir chapitre 1 page 30). Ainsi, le maintien de l'état oxydatif de la mitochondrie nécessiterait à la fois de diminuer la production de ROS, notamment par l'utilisation de voies alternatives à la glycolyse, mais également d'améliorer leur élimination (Weng et al., 2018).

Ces études montrent que la mitochondrie regrouperait plusieurs cibles qui devraient être visées ensemble pour permettre le maintien de l'homeostasie mitochondriale et ainsi envisager de nouvelles thérapies potentielles pour la MP.

Bien que nos résultats nous aient conduits à privilégier l'hypothèse qu'une altération du métabolisme du pyruvate, mettant probablement en jeu le MPC et/ou la PDH, représente un acteur majeur dans la physiopathologie de la MP et pour la recherche de cibles thérapeutiques, d'autres acteurs sont potentiellement impliqués et pourraient ouvrir d'autres pistes thérapeutiques.

## C. Perspectives

### 1. Diagnostic : Amélioration du biomarqueur

Ce travail doctoral a conduit au développement d'un biomarqueur prometteur pour le diagnostic de la MP, qui a débouché sur le dépôt d'une demande de brevet. Néanmoins, sa

transposition en routine clinique nécessite encore de nombreuses étapes afin d'améliorer à la fois sa sensibilité et sa spécificité. Pour cela, nous allons prochainement analyser des échantillons de patients PSP et MSA fournis par le NIH. A l'instar d'une étude récente effectuée sur des échantillons de plasma de patients PD, PSP et MSA (Pathan et al., 2021), nous espérons montrer que notre biomarqueur sérique permet le diagnostic différentiel de la MP. De plus, ces nouveaux échantillons nous permettront potentiellement d'affiner notre biomarqueur afin d'optimiser le compromis entre sensibilité et spécificité.

Enfin, les dérégulations que nous avons observées dans la phase prodromale sont limitées aux modèles animaux, notre biomarqueur n'ayant été testé que chez des patients nouvellement diagnostiqués avec un score moyen de 14,9 à l'UPDRS III et de 1,5 pour l'échelle de Hoehn et Yahr. Afin d'évaluer les capacités diagnostiques de notre biomarqueur dans la phase prodromale chez l'homme, des demandes d'échantillons de patients à risque de développer la MP ont été effectuées. Dans le cas où ces études mettraient en avant que notre biomarqueur n'est pas prédictif à ce stade, elles permettraient néanmoins d'améliorer sa performance pour le diagnostic non invasif de patients *de novo*.

Dans un futur proche, notre biomarqueur devra être évalué sur des instruments récemment développés pour la routine clinique tel que le système IVDr 600 MHz. Nous devons nous assurer que l'ensemble des métabolites de notre biomarqueur est détectable à ce champ magnétique.

## 2. Vers une thérapie curative de la MP ?

### a. MPC

Afin de rendre le blocage du MPC envisageable en tant qu'approche thérapeutique chez le patient, il est nécessaire de définir clairement sa fenêtre d'action optimale, notamment une fois que la pathologie est déjà installée. Pour cela, le MSDC-0160 pourrait être utilisé suite à une lésion partielle bilatérale induite par l'infusion de 6-OHDA comme dans l'étude 1. Ainsi, il serait possible d'observer son effet en fonction des différentes phases de la MP mais également sur les différents symptômes associés à la maladie. Notamment, les symptômes neuropsychiatriques n'ont pour le moment pas été étudiés dans le cadre du blocage du MPC malgré l'implication de voies communes entre ce type d'affections et le blocage du MPC comme le métabolisme des lipides. (Ciobanu et al., 2021). Pourtant, nous avons mis en évidence que le blocage du MPC entraînait une augmentation de la beta-

oxydation affectant donc le métabolisme des lipides. Le blocage du MPC pourrait donc avoir des effets sur ce type de troubles neuropsychiatriques, et ainsi permettre une prise en charge de plusieurs types de symptômes de la MP.

### *b. PDH*

Afin d'étudier plus spécifiquement le rôle de cette enzyme dans la physiopathologie de la MP, nous avons débuté des expériences afin de diminuer l'expression de la PDH dans le striatum d'animaux naïfs via l'infusion d'un AAV9 codant pour un miR anti-PDH, dirigé contre la sous unité E1 de la PDH. Nous faisons l'hypothèse que cette baisse d'expression de la PDH au niveau striatal permettra de reproduire les dérégulations métaboliques observées chez nos animaux parkinsoniens ainsi que les symptômes moteurs et non moteurs associés et la dénervation dopaminergique. Après le test de 4 constructions d'AAV différentes, ainsi que l'optimisation des coordonnées d'infusion, l'évaluation des comportements motivés et moteurs est en cours chez des animaux ayant reçu la construction privilégiée.

Le choix d'utiliser un AAV9 repose sur ses capacités à être transporté rétrogradement jusqu'à la SNc (Castle et al., 2014), ce qui devrait permettre une atteinte de la voie nigro-striée dans son ensemble. Néanmoins, si l'hypothèse de la diminution de la PDH au sein du striatum dorsal ne se confirme pas, une autre stratégie d'infection plus contraignante pourra alors être envisagée, comme dans l'étude de Carolyn Ojano-Dirain et al, où une infection du striatum et de la SNc a été nécessaire pour induire un syndrome de type parkinsonien (Ojano-Dirain et al., 2010).

Dans le cas où la dérégulation de la PDH n'induirait pas de dénervation et/ou de troubles comportementaux de type parkinsonien, une seconde approche serait de la déréguler dans un contexte parkinsonien. En effet, bien que la PDH soit dérégulée dans nos 2 études, on ne peut déterminer si cette modification représente une des causes du phénotype parkinsonien que nous observons ou un mécanisme compensatoire mis en place pour limiter les effets de la neurotoxine.

En parallèle de l'ensemble de ces expériences potentielles, des analyses métabolomiques seront réalisées afin de s'assurer de la reproduction des dérégulations précédemment observées à la fois au niveau sanguin et tissulaire.

A l'instar des expériences que nous avons réalisées pour bloquer le MPC, une stratégie en deux temps pourrait être appliquée avec tout d'abord l'utilisation d'un modèle 6-OHDA unilatéral plus simple à mettre en place, puis l'utilisation du modèle de lésion partielle bilatérale compilé à une caractérisation comportementale.

### c. Détermination d'autres cibles

Plusieurs approches pourraient être envisagées afin d'obtenir une vision plus globale des acteurs du métabolisme impliqués dans la physiopathologie de la MP et de déterminer d'autres cibles thérapeutiques éventuelles.

Par exemple, l'approche Hypériorion<sup>®</sup>, développée par l'équipe de Laurent Le Cam à l'institut de recherche en cancérologie de Montpellier et utilisant la cytométrie de masse par imagerie sur tranches de cerveaux, pourrait permettre d'observer et d'analyser l'ensemble des acteurs du métabolisme du pyruvate (environ 15 enzymes) dont la PDH et les sous unités du MPC.

Par la suite, afin d'évaluer ce qui relie ces acteurs et tenter de mieux comprendre leur rôle, l'utilisation d'outils mathématiques permettant de reconstruire les voies et flux métaboliques telle que l'analyse du bilan des flux (*Flux balance analysis*), intégrant tous types de données comme des dérégulations métaboliques, pourrait être envisagée. Ce type d'approche permettant la modélisation de l'ensemble du corps humain (Thiele et al., 2020) a notamment été utilisée pour le cerveau, pour étudier les interactions entre astrocytes et neurones (Çakur et al., 2007), mais également dans le cadre de la MP par Supandi et ses collaborateurs (Supandi & van Beek, 2018) qui, à partir de mesure d'analyse d'expression de gènes et de micro-ARNs, ont effectué une reconstruction des flux estimés au sein des neurones dopaminergiques de la SNC.

Au-delà des dérégulations métaboliques que nous avons observées, ce type de modèle pourrait également être alimenté par des approches *in vivo* de fluxomique par RMN (Hasenour et al., 2020; Hui et al., 2020). Ainsi, le but serait par exemple de suivre l'intégration de glucose marqué au <sup>13</sup>C dans le cycle TCA et de mesurer de façon précise les flux énergétiques (Vacanti et al., 2014). De la même façon, des corps cétoniques marqués au <sup>13</sup>C pourraient aussi être administrés afin de quantifier leur implication dans la production d'énergie. Cela permettrait

de confronter les modèles mathématiques aux réalités *in vivo* et ainsi permettre leur ajustement pour qu'ils soient le plus performant possible.

Ainsi, au-delà des deux hypothèses sur lesquelles nous travaillons actuellement, l'intégration de nos données métaboliques et enzymatiques dans un modèle mathématique pourrait nous apporter une cartographie plus complète des voies dérégulées dans nos modèles. L'objectif serait de pouvoir prédire les causes et les conséquences de n'importe quelles dérégulations d'enzymes ou de voies. En ce sens, des discussions avec Delphine Ropers, chercheuse à l'INRIA (institut national de recherche en science et technologie du numérique) et spécialiste de ce type d'approche, ont été entamées au cours de l'année 2021.

# Conclusion

Mon travail de thèse a donc permis d'établir, pour la première fois, une empreinte métabolique commune à plusieurs modèles animaux de la MP et à différentes cohortes de patients parkinsoniens. Ces observations ont débouché sur la construction d'un biomarqueur, composé de 6 métabolites, efficace pour le diagnostic de la MP aussi bien chez l'animal que chez les patients de novo. De façon intéressante, certaines de ces dérégulations ont été associées à la phase prodromale de la maladie chez l'animal et nécessitent d'être confirmées chez des patients présentant des risques élevés de développer la MP.

De même, bien que la spécificité de notre biomarqueur pour la MP au regard d'autres pathologies neurodégénératives reste à évaluer, notre approche translationnelle apporte une preuve de concept pour le développement de biomarqueur sanguin dans le cadre de la MP et confirme l'intérêt de la métabolomique en clinique.

Au-delà du développement de ce biomarqueur, mon travail a permis de mettre en évidence que l'altération du métabolisme du pyruvate pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la MP, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de la pathologie. Ces résultats ouvrent également la perspective du développement de nouvelles approches thérapeutiques. En ce sens, nous avons étudié le rôle du MPC, acteur central du métabolisme du pyruvate dans le couplage entre la glycolyse et le cycle TCA. Dans un contexte parkinsonien, le blocage du MPC a conduit à des effets neuroprotecteurs et à une amélioration comportementale accompagnés par une redirection du métabolisme énergétique, suggérant que le MSDC-0160 pourrait être une thérapie prometteuse pour la MP.

L'ensemble de nos données laisse penser que la métabolique par RMN peut tout à fait trouver sa place en clinique en complément des outils déjà existants. Les nombreux travaux, résultats et publications basés sur la RMN attestent de ce fort potentiel et continuent de contribuer au développement de cette approche. Bien que très robuste, l'enjeu principal pour son utilisation future consistera en l'amélioration et la démocratisation des méthodes permettant son automatisation ainsi qu'à l'harmonisation de l'ensemble du workflow d'analyse des échantillons.

Au final, bien que la route soit encore longue avant de pouvoir diagnostiquer précocement la MP à l'aide d'un biomarqueur sanguin et proposer des thérapies curatives, ce travail doctoral, entre modèles animaux et patients, renforce la pertinence de l'usage d'une approche translationnelle afin de répondre aux enjeux diagnostiques et thérapeutiques de la MP.





# Annexes

## Annexe 1: Échelle MDS-UPDRS

### MDS-UPDRS

La nouvelle version de l'UPDRS sponsorisée par la MDS se base sur la critique formulée par la Task-Force pour les échelles d'évaluation dans la maladie de Parkinson (Mov. Disord 2003 ; 18 : 738-750).

Par la suite, la MDS recruta un Président dans le but d'organiser un programme procurant à la communauté des mouvements anormaux, une nouvelle version de l'UPDRS qui maintiendrait le format général de l'UPDRS original, mais qui prendrait en compte les faiblesses et les ambiguïtés identifiées dans la critique de l'échelle. Le Président créa des sous-commissions composées d'un responsable et de membres. Chaque partie a été écrite par des membres appropriés des sous-commissions, puis a été revue et ratifiée par le groupe entier. Ces membres sont listés ci-dessous.

Le MDS ou UPDRS comprend 4 parties :

- Partie I : expériences non motrices de la vie quotidienne
- Partie II : expériences motrices de la vie quotidienne
- Partie III : examen moteur
- Partie IV : complications motrices

La partie I se compose de deux parties :

IA : concernant un nombre de comportements qui sont évalués par l'investigateur avec toutes les informations pertinentes provenant des patients et des aidants.

IB : est complétée par le patient avec ou sans l'aide de l'aidant, mais indépendamment de l'investigateur. Ceci peut néanmoins être revu par l'évaluateur pour s'assurer que toutes les questions ont une réponse claire et l'évaluateur peut aider en expliquant toute ambiguïté éventuellement perçue.

La partie II est destinée à être un questionnaire auto-administré comme dans la partie IB, mais peut être revue par l'investigateur pour s'assurer qu'elle ait été remplie de façon complète et claire.

On note que les versions officielles de la partie IA, partie IB et partie II de la MDS-UPDRS n'ont pas d'évaluation séparée en condition ON et OFF. Cependant, pour des programmes ou des protocoles individuels, les mêmes questions peuvent être employées séparément pour évaluer le patient en condition ON et OFF.

La partie III comporte des instructions à donner par l'évaluateur au patient ou pour qu'il lui en fasse la démonstration ; cette partie est remplie par l'évaluateur.

La partie IV donne des instructions à l'investigateur ainsi que des instructions qui doivent être lues au patient. Cette partie intègre des informations provenant de patients avec les observations et les jugements cliniques de l'évaluateur et est remplie par l'évaluateur.

Les auteurs de la nouvelle version sont :

Président : Christopher G. Goetz

Partie I : Werner Poewe (Président), Bruno Dubois, Anette Schrag

Partie II : Matthew B. Stern (Président), Anthony E. Lang, Peter A. Lewitt

Partie III : Stanley Fahn (Président), Joseph Jankovic, C. Warren Olanow

Partie IV : Pablo Martinez-Martin (Président), Andrew Lees, Olivier Rascol, Bob van Hilten

Standards de développement : Glenn T. Stebbins (Président), Robert Holloway, David Nyenhuis

Annexes : Cristina Sampaio (Présidente), Richard Dodel, Jaime Kulisevsky

Evaluation statistique : Barbara Tilley (Présidente), Sue Leurgans, Jean Teresi

Consultant : Stephanie Shaftman, Nancy LaPelle

Personne à contacter :

International Parkinson and Movement Disorder Society

555 East Wells Street, Suite 1100

Milwaukee, WI USA 53202

Téléphone : 414-276-2145

Email : [ratingscales@movementdisorders.org](mailto:ratingscales@movementdisorders.org)

1<sup>er</sup> Juillet 2008

## PARTIE I : EXPERIENCE NON MOTRICE DE LA VIE QUOTIDIENNE

Vue d'ensemble : cette partie de l'échelle évalue l'impact non moteur de la maladie de Parkinson sur les expériences des patients dans leur vie quotidienne. Il y a 13 questions.

La partie IA est administrée par l'évaluateur (6 questions) et se focalise sur des comportements complexes.

La partie IB est une composante d'un questionnaire auto-administré par le patient couvrant 7 questions sur les expériences non motrices dans la vie quotidienne.

### Partie IA :

En administrant la partie IA, l'investigateur doit suivre les directives suivantes :

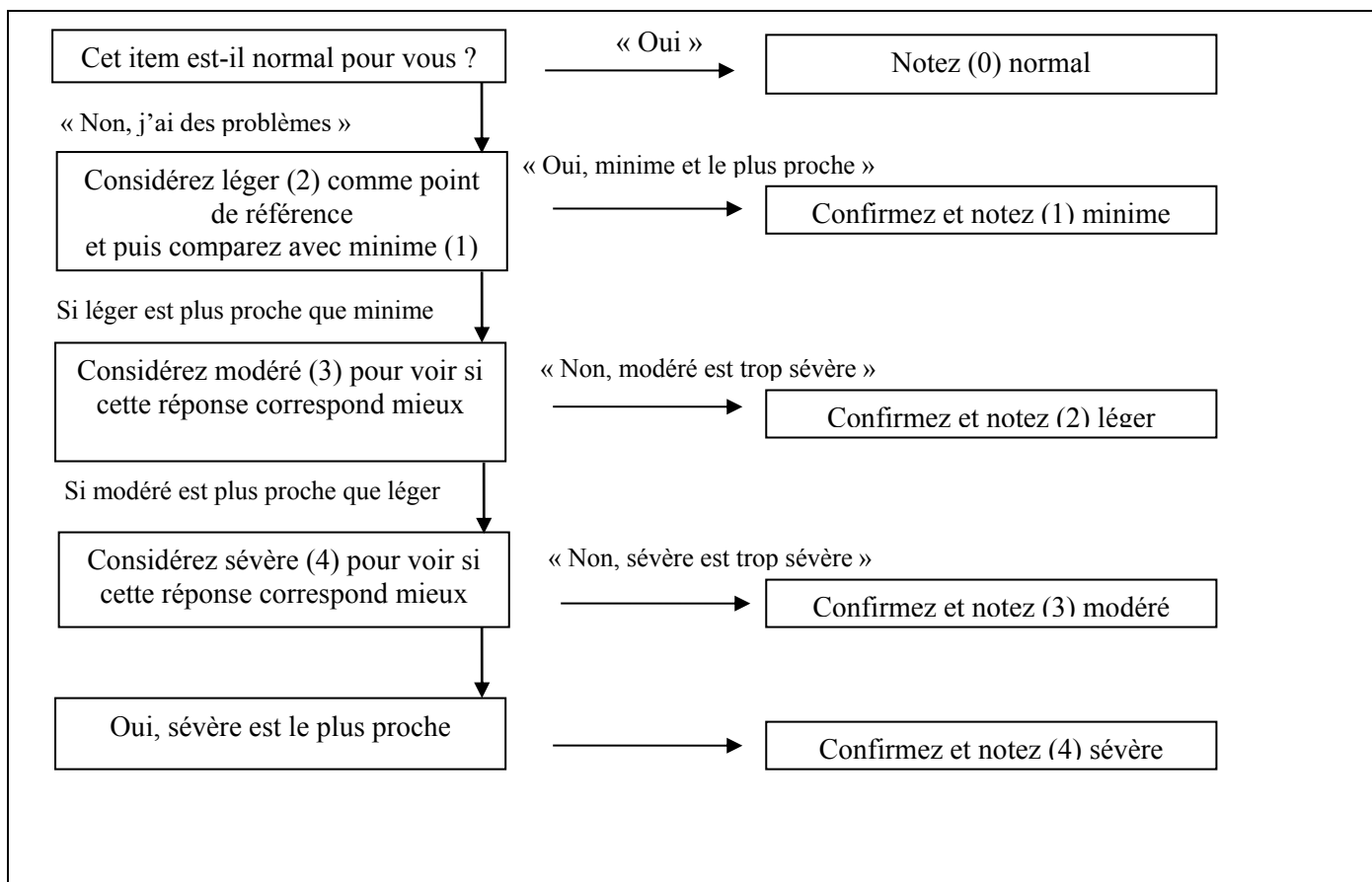
- 1- Inscrire en haut du formulaire l'origine principale de l'information recueillie qu'elle provienne soit du patient, soit de l'aidant, soit du patient et de l'aidant dans des proportions égales.
- 2- La réponse à chaque item doit se référer à la période correspondant à la semaine précédente incluant le jour où l'information est recueillie.
- 3- Tous les items doivent être notés par un nombre entier (pas de demi-point, ni de score manquant). Si d'aventure, un item ne peut être appliqué ou être évalué (ex : un amputé ne pouvant marcher), cet item est noté NE pour Non Evaluable.
- 4- Les réponses doivent refléter le niveau habituel de la fonction et des mots tels que : « habituellement », « généralement », « la plus part du temps » peuvent être utilisés avec les patients.
- 5- Chaque question comporte un texte que vous devez lire (instructions aux patients/à l'aidant). Après cette formulation, vous pouvez élaborer et faire des essais d'approfondissement en vous basant sur les symptômes cibles esquissés dans les instructions à l'examineur. Vous ne devez PAS LIRE aux malades, ni à l'aidant, les options correspondant aux scores d'évaluation parce que celles-ci ont été écrites en terminologie médicale. A partir de l'interrogatoire et de vos approfondissements, vous utiliserez votre jugement médical afin d'arriver à la meilleure réponse.
- 6- Les patients peuvent avoir des co-morbidités et d'autres problèmes médicaux pouvant affecter leur fonction. Vous et le patient devez évaluer le problème tel qu'il existe globalement et ne pas essayer de séparer les éléments dus à la maladie de Parkinson par rapport à d'autres causes.

## EXEMPLE DE NAVIGATION A TRAVERS LES OPTIONS DE REPONSES POUR LA PARTIE IA

Stratégies suggérées afin d'obtenir les réponses les plus précises : après lecture des instructions au patient, vous aurez besoin d'enquêter le champ entier de la discussion pour déterminer le normal de l'anormal. Si vos questions n'identifient aucun problème dans ce domaine, enregistrez 0 et passez à la question suivante.

Si vos questions identifient un problème dans ce domaine, vous devez par la suite travailler avec un point d'ancrage de référence qui correspond au milieu de la gamme des réponses (option 2 ou léger) pour déterminer si le patient fonctionne à ce niveau, mieux ou moins bien. Vous ne lirez pas les choix des réponses au patient, car les réponses utilisent une terminologie clinique. Vous poserez suffisamment de questions tests pour déterminer la réponse que vous devrez coder.

Travaillez les options supérieures ou inférieures avec le patient pour identifier la réponse la plus appropriée, en vous donnant une vérification finale en excluant les options supérieures et inférieures à la réponse sélectionnée.



**MDS-UPRS**  
**Partie I : Expérience Non Motrice de la vie quotidienne (EnMVQ)**

**Partie IA : comportements complexes (à compléter par l'évaluateur)**

Source principale d'information :

- patient       aidant       patient et aidant en proportion égale

A lire au patient : je vais vous poser 6 questions à propos de comportements que vous pouvez avoir ou non présenté(s). Certaines questions font référence à des problèmes communs, et d'autres à des problèmes moins communs. Si vous avez des problèmes dans un de ces domaines, choisissez s'il vous plait la meilleure réponse qui décrit comment vous vous êtes senti(e) LA PLUPART DU TEMPS pendant la SEMAINE PRECEDENTE. Si vous n'êtes pas gêné(e) par un problème, vous répondez simplement NON. Je vais essayer d'être consciencieux, je peux donc être amené à vous poser des questions qui n'ont rien à voir avec vous-même.

**1.1 ALTERATION COGNITIVE**

**SCORE**

Instructions à l'investigateur : Prendre en compte tous types de niveau d'altération des fonctions cognitives y compris le ralentissement cognitif, l'altération du raisonnement, la perte de mémoire, les déficits de l'attention et de l'orientation. Evaluer leur impact sur les activités de la vie quotidienne telles qu'elles sont perçues par le patient et/ou l'aidant.

*Instructions aux patients [et à l'aidant] : Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu des problèmes pour vous rappeler des choses, pour suivre des conversations, pour fixer votre attention, pour avoir des pensées claires ou pour trouver votre chemin dans la maison ou en ville ? [Si oui, l'examinateur demande au patient ou à l'aidant de donner des détails et des approfondissements pour information.]*

- 0 : Normal : Pas d'altération cognitive.
- 1 : Minime : Altération appréciée par le patient ou l'aidant sans interférence concrète avec l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.
- 2 : Léger : Dysfonctionnement cognitif cliniquement évident, mais avec seulement des interférences minimales avec l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.
- 3 : Modéré : Les déficits cognitifs interfèrent mais n'empêchent pas l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.
- 4 : Sévère : Le dysfonctionnement cognitif empêche l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.

1.2 HALLUCINATIONS ET PSYCHOSE	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Considérez à la fois les illusions (<u>interprétations erronées de stimuli réels</u>) et les hallucinations (<u>fausses sensations spontanées</u>). Considérez tous les principaux domaines sensoriels (<u>visuel, auditif, tactile, olfactif et gustatif</u>). Déterminez la présence de sensations non formées (<b>par exemple : sentiment de présence ou fausses impressions de flottement</b>) aussi bien que des sensations formées (<b>pleinement développées et détaillées</b>). Évaluez la capacité du patient à critiquer ses hallucinations et identifiez l'existence d'illusions et des pensées psychotiques.</p> <p><u>Instructions aux patients [et à l'aidant]</u> : <i>Au cours de la semaine précédente, avez-vous vu, entendu, senti ou ressenti des choses qui n'existaient pas réellement ? [Si oui, l'examineur demande au patient ou à l'aidant de donner des détails ou des approfondissements pour information.]</i></p> <p>0 : Normal : Pas d'hallucinations, ni de comportement psychotique.</p> <p>1 : Minime : Illusions ou hallucinations non formées, mais le patient les reconnaît et les critique.</p> <p>2 : Léger : Hallucinations structurées indépendantes des stimuli environnementaux. Pas de perte de sens critique à leur égard.</p> <p>3 : Modéré : Hallucinations structurées non critiquées par le patient.</p> <p>4 : Sévère : Le patient a des idées délirantes ou paranoïaques.</p>	<input data-bbox="1393 748 1465 822" type="text"/>
<p><b>1.3 HUMEUR DEPRESSIVE</b></p> <p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Considérez la baisse d'humeur, la tristesse, la désespérance, les sentiments de vide ou la perte de plaisir. Déterminez leur présence et leur durée pendant la période de la semaine précédente et évaluez leur interférence avec l'aptitude du malade à mener sa routine quotidienne et à participer à des interactions sociales.</p> <p><u>Instructions aux patients [et à l'aidant]</u> : <i>Au cours de la semaine précédente, vous êtes vous senti(e) sans ressort, triste, désespéré(e) ou incapable d'apprécier les choses ? Si oui, ce sentiment durait-il plus d'un jour à la fois ? Rendait-il difficile pour vous le fait de mener vos activités habituelles et d'être avec les autres ? [Si oui, l'examineur demande au patient ou à l'aidant de donner des détails et des approfondissements pour information.]</i></p> <p>0 : Normal : Pas d'humeur dépressive.</p> <p>1 : Minime : Episodes d'humeur dépressive ne durant pas plus d'un jour à la fois. Pas d'interférence avec l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.</p> <p>2 : Léger : Humeur dépressive durant plusieurs jours, mais sans interférence avec des activités et des interactions sociales normales.</p> <p>3 : Modéré : Humeur dépressive interférant avec l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.</p> <p>4 : Sévère : Humeur dépressive empêchant l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.</p>	<input data-bbox="1393 1733 1465 1807" type="text"/>

1.4 ETAT ANXIEUX	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Déterminez les sensations de nervosité, de tension, d'inquiétude ou d'anxiété (incluant les attaques de panique) au cours de la semaine précédente et évaluez leur durée et les interférences avec l'aptitude du patient à mener des activités journalières routinières et à participer à des interactions sociales.</p> <p><u>Instructions aux patients [et à l'aidant]</u> : Au cours de la semaine précédente, vous êtes vous senti(e) nerveux, inquiet ou tendu(e) ? Si oui, ce sentiment durait-il plus d'1 jour à la fois. Est-ce que cela a constitué pour vous une difficulté pour suivre vos activités habituelles ou pour être avec d'autres personnes. [Si oui, l'examinateur demande au patient ou à l'aidant de donner des détails et des approfondissements pour information.]</p> <p>0 : Normal : Pas de sentiment d'anxiété.</p> <p>1 : Minime : Sentiments anxieux présents, mais ne durant pas plus d'un jour à la fois. Pas d'interférence avec l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.</p> <p>2 : Léger : Sentiments anxieux persistant plus d'un jour à la fois, mais sans interférence avec l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.</p> <p>3 : Modéré : Sentiments anxieux interférant avec, mais n'empêchant pas, l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.</p> <p>4 : Sévère : Sentiments anxieux empêchant l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales.</p>	<input data-bbox="1393 719 1465 792" type="text"/>
<p><b>1.5 APATHIE</b></p> <p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Déterminez le niveau d'activité spontanée, d'assurance, de motivation et d'initiative, et évaluez l'impact d'une réduction de performance sur les activités quotidiennes routinières et les interactions sociales. Ici, l'investigateur devra essayer de faire la différence entre l'apathie et des symptômes similaires qui seraient mieux expliqués par la dépression.</p> <p><u>Instructions aux patients [et à l'aidant]</u> : Au cours de la semaine précédente, vous êtes vous senti(e) indifférent à faire des activités ou à être avec des gens ? [Si oui, l'examinateur demande au patient ou à l'aidant de donner des détails et des approfondissements pour information.]</p> <p>0 : Normal : Pas d'apathie.</p> <p>1 : Minime : L'apathie perçue par le patient et/ou l'aidant, mais sans interférence avec les activités quotidiennes ni les interactions sociales.</p> <p>2 : Léger : L'apathie interfère avec des activités et des interactions sociales isolées.</p> <p>3 : Modéré : L'apathie interfère avec la plupart des activités et des interactions sociales.</p> <p>4 : Sévère : Attitude passive et retirée, avec perte totale d'initiative.</p>	<input data-bbox="1393 1697 1465 1771" type="text"/>



1.6 SIGNES DE SYNDROME DE DYSREGULATION DOPAMINERGIQUE	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Déterminez la participation du malade à diverses activités incluant par exemple une passion atypique ou excessive du jeu (ex : casino ou billets de loterie), des pulsions ou des intérêts sexuels atypiques ou excessifs (ex : intérêt inhabituel à la pornographie, la masturbation, sollicitation exagérée vis-à-vis du partenaire), ainsi qu'à d'autres activités répétitives (ex : passe-temps favoris, démontage d'objets, tri ou rangement), ou à la prise de médicaments non prescrits sans raison clinique (ex : comportement addictif). Évaluez l'impact de tels activités/comportements anormaux sur la vie personnelle du patient et sur celle de sa famille et de ses relations sociales (incluant le besoin d'emprunter de l'argent ou d'autres difficultés financières comme le retrait de cartes bancaires, des conflits familiaux majeurs, la perte d'une partie du temps de travail, le fait de sauter des repas ou de manquer de sommeil en raison de ces activités).</p> <p><u>Instructions aux patients [et à l'aidant]</u> : <i>Au cours de la semaine précédente, avez-vous ressenti(e) des fortes pulsions inhabituelles que vous avez eues du mal à contrôler. ? Vous sentez-vous poussé(e) à faire ou à penser à des choses et éprouvez-vous de la difficulté à les arrêter ?</i> [Donnez des exemples au patient tels que la passion du jeu, le nettoyage, l'utilisation de l'ordinateur, la prise de médicament supplémentaire, avoir une attitude addictive au sexe et à la nourriture, tout cela en fonction des patients.]</p> <p>0 : Normal : Pas de problème présent.</p> <p>1 : Minime : Des problèmes existent mais n'entraînent habituellement pas de difficulté pour le patient ou la famille / l'aidant.</p> <p>2 : Léger : Des problèmes existent et entraînent habituellement quelques difficultés dans la vie personnelle du patient et sa vie de famille.</p> <p>3 : Modéré : Des problèmes existent et entraînent habituellement beaucoup de difficultés dans la vie personnelle du patient et sa vie de famille.</p> <p>4 : Sévère : Des problèmes existent et empêchent l'aptitude du patient à mener des activités et des interactions sociales normales, ou de maintenir les standards antérieurs de sa vie personnelle et familiale.</p>	<input data-bbox="1390 1003 1461 1077" type="checkbox"/>

Les questions suivantes dans la partie I (Expérience Non Motrice de la Vie Quotidienne) (sommeil, somnolence diurne, douleur et autre sensation, problèmes urinaires, problèmes de constipation, sensation de tête vide au lever et fatigue) se trouvent dans le **Questionnaire patient** avec toutes les questions de la partie II [Expériences Motrices de la Vie Quotidienne].

## QUESTIONNAIRE POUR LE PATIENT :

### Instructions :

Ce questionnaire vous posera des questions sur vos expériences de la vie quotidienne.

Il y a 20 questions. Nous essayons d'être minutieux, certaines de ces questions peuvent de ce fait ne pas s'appliquer à votre état actuel ou passé. Si vous n'avez pas de problème, notez simplement 0 pour NON.

Lisez s'il vous plait attentivement chacune de ces questions et lisez toutes les réponses avant de sélectionner celle qui vous correspond le mieux.

Nous nous intéressons à votre fonctionnement moyen et habituel au cours de la semaine précédente incluant aujourd'hui. Certains patients peuvent faire les choses mieux à un moment de la journée qu'à d'autres. Cependant, une seule réponse est autorisée pour chaque question, ainsi notez s'il vous plait la réponse qui correspond le mieux à ce que vous pouvez faire la plupart du temps.

Vous pouvez avoir d'autres problèmes médicaux en même temps que la maladie de Parkinson. Ne vous préoccupez pas de séparer les effets de la maladie de Parkinson de ceux de ces autres problèmes médicaux. Répondez simplement à la question avec votre meilleure réponse.

Utilisez uniquement 0, 1, 2, 3, 4 pour les réponses, rien d'autre. Ne laissez pas de blanc.

Votre médecin ou infirmier peuvent revoir les questions avec vous, mais le questionnaire est destiné à être complété par les patients, soit seul ou avec leurs aidants.

Qui remplit ce questionnaire (cochez la meilleure réponse) :

patient                       aidant                       patient et aidant en proportion égale

## Partie I : EXPERIENCES NON MOTRICES DE LA VIE QUOTIDIENNE (EnMVQ)

### 1.7 PROBLEMES DE SOMMEIL

Au cours de la semaine précédente, avez-vous rencontré des problèmes pour vous endormir la nuit ou pour rester endormi pendant la nuit ? Prenez en compte la façon dont vous vous êtes senti(e) reposé(e) après vous être réveillé(e) le matin ?

SCORE

- 0 : Normal : Pas de problème.
- 1 : Minime : Des problèmes de sommeil sont présents mais n'entraînent pas habituellement de difficultés à avoir une nuit complète de sommeil.
- 2 : Léger : Des problèmes de sommeil entraînent habituellement quelques difficultés à avoir une nuit complète de sommeil.
- 3 : Modéré : Des problèmes de sommeil entraînent beaucoup de difficultés à avoir une nuit complète de sommeil, mais je dors encore habituellement plus de la moitié de la nuit.
- 4 : Sévère : Je ne dors habituellement pas la plus grande partie de la nuit.

### 1.8 SOMNOLENCE DIURNE

Au cours de la semaine précédente, avez-vous rencontré des problèmes pour rester éveillé(e) pendant la journée ?

- 0 : Normal : Pas de somnolence diurne.
- 1 : Minime : Une somnolence diurne apparaît mais je peux résister et rester éveillé(e).
- 2 : Léger : Je m'endors parfois quand je suis seul et au repos. Par exemple, pendant que je lis ou en regardant la télé.
- 3 : Modéré : Je m'endors parfois alors que je ne devrais pas. Par exemple, en mangeant ou en parlant à d'autres personnes.
- 4 : Sévère : Je m'endors souvent alors que je ne devrais pas. Par exemple, en mangeant ou en parlant à d'autres personnes.

1.9 DOULEUR ET AUTRES SENSATIONS	SCORE
<p>Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu des sensations inconfortables dans votre corps telles que douleur, courbatures, fourmillements ou crampes ?</p> <p>0 : Normal : Pas de sensations inconfortables.</p> <p>1 : Minime : Je ressens ces sensations. Cependant, je peux faire les choses et être avec d'autres personnes sans difficulté.</p> <p>2 : Léger : Ces sensations me procurent quelques problèmes quand je fais des choses et quand je suis avec d'autres personnes.</p> <p>3 : Modéré : Ces sensations me procurent beaucoup de problèmes, mais ne m'empêchent pas d'effectuer des choses ou d'être avec d'autres personnes.</p> <p>4 : Sévère : Ces sensations m'empêchent de faire des choses et d'être avec d'autres personnes.</p>	<input data-bbox="1393 488 1465 562" type="text"/>
<p><b>1.10 PROBLEMES URINAIRES</b></p> <p>Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu des difficultés à contrôler vos urines ? Par exemple, besoin urgent d'uriner, besoin d'uriner trop souvent ou accidents urinaires.</p> <p>0 : Normal : Aucun problème urinaire.</p> <p>1 : Minime : J'ai besoin d'uriner souvent ou urgemment. Cependant, ces problèmes ne causent pas de difficulté dans mes activités quotidiennes.</p> <p>2 : Léger : Les problèmes urinaires causent quelques difficultés dans mes activités quotidiennes. Cependant, je n'ai pas d'accidents urinaires.</p> <p>3 : Modéré : Les problèmes urinaires causent beaucoup de difficultés dans ma vie quotidienne, incluant des accidents urinaires.</p> <p>4 : Sévère : Je ne peux pas contrôler mes urines et utilise une garniture de protection ou une sonde urinaire.</p>	<input data-bbox="1393 1240 1465 1314" type="text"/>

<b>1.11 PROBLEMES DE CONSTIPATION</b>	<b>SCORE</b>
<p>Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu des problèmes de constipation entraînant des difficultés à aller à la selle ?</p> <p>0 : Normal : Pas de constipation.</p> <p>1 : Minime : J'ai été constipé(e). Je fais des efforts supplémentaires pour aller à la selle. Cependant, ce problème ne perturbe pas mes activités ou mon confort.</p> <p>2 : Léger : La constipation me pose quelques difficultés à faire des choses ou à me sentir confortable.</p> <p>3 : Modéré : La constipation me pose beaucoup de problème à faire les choses ou à me sentir confortable. Cependant, elle ne m'empêche pas de faire quoi que ce soit.</p> <p>4 : Sévère : J'ai habituellement besoin de l'aide physique d'un tiers pour aller à la selle.</p>	<input data-bbox="1396 492 1468 571" type="text"/>
<p><b>1.12 SENSATION DE TETE VIDE AU LEVER</b></p> <p>Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu une sensation d'évanouissement, de vertige, de brouillard lorsque vous vous levez d'une position assise ou couchée ?</p> <p>0 : Normal : Pas de sensations de vertige ou de brouillard.</p> <p>1 : Minime : Des sensations de vertige ou de brouillard surviennent. Cependant, elles ne me causent pas de problèmes à faire les choses.</p> <p>2 : Léger : Des sensations de vertige ou de brouillard m'obligent à me tenir à quelque chose, mais je n'ai pas besoin de m'asseoir ou de me recoucher.</p> <p>3 : Modéré : Des sensations de vertige ou de brouillard m'obligent à m'asseoir ou à me coucher pour éviter de m'évanouir ou de tomber.</p> <p>4 : Sévère : Des sensations de vertige ou de brouillard me conduisent à tomber ou à m'évanouir.</p>	<input data-bbox="1396 1075 1468 1153" type="text"/>
<p><b>1.13 FATIGUE</b></p> <p>Au cours de la semaine précédente, vous êtes vous senti(e) habituellement fatigué(e) ? Ce sentiment ne fait pas partie du fait d'avoir sommeil ou d'être triste.</p> <p>0 : Normal : Pas de fatigue.</p> <p>1 : Minime : La fatigue est présente. Cependant, elle ne me cause pas de problème à faire les choses ou à être avec les gens.</p> <p>2 : Léger : La fatigue me cause quelques problèmes à faire les choses ou à être avec les gens.</p> <p>3 : Modéré : La fatigue me cause beaucoup de problèmes à faire les choses ou être avec les gens. Cependant, elle ne m'empêche pas de faire quoi que ce soit.</p> <p>4 : Sévère : La fatigue m'empêche de faire des choses ou d'être avec des gens.</p>	<input data-bbox="1396 1680 1468 1758" type="text"/>

## PARTIE II : ASPECTS MOTEURS DES EXPERIENCES DE LA VIE QUOTIDIENNE

### 2.1 PAROLE (ELOCUTION)

Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu des problèmes avec votre élocution ?

- 0 : Normal : Pas du tout (aucun problème).
- 1 : Minime : Mon élocution est faible, peu articulée et inégale, mais ne conduit pas les autres à me demander de me répéter.
- 2 : Léger : Mon élocution conduit les gens à me demander de me répéter occasionnellement, mais pas tous les jours.
- 3 : Modéré : Mon élocution est assez peu claire pour que les autres me demandent de répéter chaque jour, même si la plupart de mon discours est compris.
- 4 : Sévère : La plupart ou tout mon discours ne peut être compris.

SCORE

### 2.2 SALIVATION ET FAIT DE BAVER

Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu trop de salives pendant que vous êtes éveillé(e) ou quand vous dormez ?

- 0 : Normal : Pas du tout (aucun problème).
- 1 : Minime : J'ai trop de salive, mais je ne bave pas.
- 2 : Léger : Je bave pendant mon sommeil, mais pas quand je suis éveillé(e).
- 3 : Modéré : Je bave quelquefois quand je suis éveillé(e), mais je n'utilise pas habituellement de kleenex ou de mouchoir.
- 4 : Sévère : Je bave tellement que j'ai régulièrement besoin d'utiliser des kleenex ou un mouchoir pour protéger mes vêtements.

<b>2.3 MASTICATION ET DEGLUTITION</b>	<b>SCORE</b>
<p>Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu habituellement des problèmes en avalant des comprimés ou en prenant vos repas ? Avez-vous eu besoin de couper ou d'écraser vos comprimés, ou que vos repas soient écrasés, hachés ou mixés pour éviter de vous étouffer ?</p> <p>0 : Normal : Pas de problème.</p> <p>1 : Minime : J'ai conscience d'une lenteur dans ma mastication ou de faire des efforts accrus quand j'avale, mais je ne m'étouffe pas ou je n'ai pas besoin que ma nourriture soit préparée de façon spéciale.</p> <p>2 : Léger : J'ai besoin d'avoir mes comprimés coupés ou ma nourriture spécialement préparée parce que j'ai des problèmes en mâchant ou en avalant, mais je ne me suis pas étouffé(e) au cours de la semaine précédente.</p> <p>3 : Modéré : Je me suis étouffé(e) au moins une fois la semaine précédente.</p> <p>4 : Sévère : A cause de problèmes de mastication et de déglutition, j'ai besoin d'une sonde gastrique.</p>	<input data-bbox="1390 517 1461 591" type="text"/>
<p><b>2.4 TACHES ALIMENTAIRES</b></p> <p>Au cours de la semaine précédente, avez-vous habituellement eu des problèmes à manipuler votre nourriture et à utiliser des couverts ? Par exemple, avez-vous eu des problèmes à manger des aliments qu'on mange avec les doigts ou à utiliser des fourchettes, des couteaux, des cuillères, des baguettes ?</p> <p>0 : Normal : Pas du tout (pas de problème).</p> <p>1 : Minime : Je suis lent, mais je n'ai besoin d'aucune aide pour manipuler ma nourriture et je n'ai pas renversé de nourriture pendant que je mangeais.</p> <p>2 : Léger : Je suis lent(e) quand je mange et je renverse occasionnellement ma nourriture. Je peux avoir besoin d'aide dans un petit nombre de tâches comme couper la viande.</p> <p>3 : Modéré : J'ai besoin d'aide dans beaucoup de tâches alimentaires mais je peux en faire certaines seul(e).</p> <p>4 : Sévère : J'ai besoin d'aide pour la plupart ou toutes les tâches alimentaires.</p>	<input data-bbox="1394 1391 1469 1464" type="text"/>

<b>2.5 HABILLAGE</b>	<b>SCORE</b>
<p>Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu habituellement des problèmes pour vous habiller ? Par exemple, êtes-vous lent(e) ou avez-vous besoin d'aide pour vous boutonner, pour utiliser des fermetures éclair, pour mettre ou enlever vos vêtements ou vos bijoux ?</p> <p>0 : Normal : Pas du tout (aucun problème).</p> <p>1 : Minime : Je suis lent(e) mais je n'ai pas besoin d'aide.</p> <p>2 : Léger : Je suis lent(e) et j'ai besoin d'aide pour quelques tâches d'habillement (boutons, bracelets).</p> <p>3 : Modéré : J'ai besoin d'aide pour de nombreuses tâches d'habillement.</p> <p>4 : Sévère : J'ai besoin d'aide pour la plupart ou toutes les tâches d'habillement.</p>	<input data-bbox="1393 495 1469 568" type="text"/>
<p><b>2.6 HYGIENE</b></p> <p>Au cours de la semaine précédente, avez-vous été habituellement lent ou avez-vous eu besoin d'aide pour vous laver, prendre un bain, vous raser, vous brosser les dents, vous peigner ou avec tout autre soin d'hygiène personnelle ?</p> <p>0 : Normal : Pas du tout (aucun problème).</p> <p>1 : Minime : Je suis lent(e), mais je n'ai besoin d'aucune aide.</p> <p>2 : Léger : J'ai besoin de quelqu'un pour m'aider dans quelques tâches concernant l'hygiène.</p> <p>3 : Modéré : J'ai besoin de quelqu'un pour de nombreuses tâches concernant l'hygiène.</p> <p>4 : Sévère : J'ai besoin de quelqu'un pour la plupart ou toutes les tâches concernant l'hygiène.</p>	<input data-bbox="1393 1413 1469 1487" type="text"/>



2.7 ECRITURE	SCORE
<p data-bbox="132 315 1342 371">Au cours de la semaine précédente, les gens ont-ils eu habituellement des problèmes à lire votre écriture ?</p> <p data-bbox="132 434 735 468">0 : Normal : Pas du tout (aucun problème).</p> <p data-bbox="132 495 1294 528">1 : Minime : Mon écriture est lente, maladroite ou inégale, mais tous les mots sont lisibles.</p> <p data-bbox="132 555 927 589">2 : Léger : Certains mots sont peu clairs et difficiles à lire.</p> <p data-bbox="132 616 983 649">3 : Modéré : Beaucoup de mots sont peu clairs et difficiles à lire.</p> <p data-bbox="132 676 975 710">4 : Sévère : La plupart des mots ou tous les mots sont illisibles.</p>	<input data-bbox="1393 506 1465 580" type="text"/>
<p data-bbox="132 1133 802 1167"><b>2.8 PASSE-TEMPS FAVORIS ET AUTRES ACTIVITES</b></p> <p data-bbox="132 1193 1342 1249">Au cours de la semaine précédente, avez-vous habituellement rencontré des problèmes dans vos passe-temps favoris ou dans d'autres choses que vous aimez faire ?</p> <p data-bbox="132 1312 735 1346">0 : Normal : Pas du tout (aucun problème).</p> <p data-bbox="132 1373 1034 1406">1 : Minime : Je suis un peu lent, mais je fais ces activités facilement.</p> <p data-bbox="132 1433 895 1467">2 : Léger : J'ai quelques difficultés à faire ces activités.</p> <p data-bbox="132 1494 1318 1550">3 : Modéré : J'ai des problèmes majeurs à faire ces activités, mais j'en fais encore la plupart.</p> <p data-bbox="132 1576 1070 1610">4 : Sévère : Je suis incapable de faire la plupart ou toutes ces activités.</p>	<input data-bbox="1393 1335 1465 1408" type="text"/>

2.9 SE TOURNER DANS LE LIT	SCORE
<p data-bbox="130 282 1342 342">Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu habituellement des problèmes pour vous tourner dans le lit ?</p> <p data-bbox="130 405 735 436">0 : Normal : Pas du tout (aucun problème).</p> <p data-bbox="130 465 1222 497">1 : Minime : J'ai un peu de difficulté à me tourner, mais je n'ai besoin d'aucune aide.</p> <p data-bbox="130 526 1315 586">2 : Léger : J'ai beaucoup de difficulté à me tourner et j'ai occasionnellement besoin de l'aide de quelqu'un.</p> <p data-bbox="130 616 1078 647">3 : Modéré : Pour me tourner, j'ai souvent besoin de l'aide de quelqu'un.</p> <p data-bbox="130 676 1054 707">4 : Sévère : Je suis incapable de me tourner sans l'aide de quelqu'un.</p>	<div data-bbox="1390 465 1465 539" style="border: 1px solid black; width: 47px; height: 33px; margin: 0 auto;"></div>
<p data-bbox="130 1140 399 1171"><b>2.10 TREMBLEMENT</b></p> <p data-bbox="130 1200 1150 1232">Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu habituellement des tremblements ?</p> <p data-bbox="130 1294 852 1326">0 : Normal : Pas du tout. Je n'ai pas de tremblement.</p> <p data-bbox="130 1355 1315 1415">1 : Minime : Un tremblement survient, mais ne me cause pas de problème dans mes activités.</p> <p data-bbox="130 1444 1315 1505">2 : Léger : Un tremblement me cause des problèmes, mais seulement dans un petit nombre d'activités.</p> <p data-bbox="130 1534 1315 1594">3 : Modéré : Un tremblement me cause des problèmes dans beaucoup de mes activités quotidiennes.</p> <p data-bbox="130 1624 1315 1684">4 : Sévère : Un tremblement me cause des problèmes avec la plupart ou toutes mes activités.</p>	<div data-bbox="1390 1361 1465 1435" style="border: 1px solid black; width: 47px; height: 33px; margin: 0 auto;"></div>



2.13 BLOCAGES A LA MARCHE (FREEZING)	SCORE
<p>Au cours de la semaine précédente, pendant votre journée habituelle, quand vous marchez, vous arrêtez-vous soudainement ou vous bloquez-vous comme si vos pieds restaient collés au sol ?</p> <p>0 : Normal : Pas du tout (aucun problème).</p> <p>1 : Minime : Je me bloque brièvement, mais je peux facilement redémarrer. Je n'ai pas besoin de l'aide de quelqu'un d'autre ou d'une assistance de marche (cane ou déambulateur) en raison de ce blocage.</p> <p>2 : Léger : Je me bloque et j'ai des problèmes pour redémarrer, mais je n'ai pas besoin de l'aide d'une autre personne, ni d'une assistance de marche (cane ou déambulateur) en raison de ce déblocage.</p> <p>3 : Modéré : Quand je me bloque, j'ai beaucoup de problèmes à redémarrer et, en raison de ce blocage, j'ai parfois besoin d'utiliser une assistance à la marche ou l'aide de quelqu'un.</p> <p>4 : Sévère : En raison de ce blocage, la plupart du temps ou tout le temps, j'ai besoin d'utiliser une assistance à la marche ou l'aide de quelqu'un.</p>	<input data-bbox="1390 526 1461 600" type="text"/>
<p>Ceci complète le questionnaire. Nous avons pu vous interroger sur des problèmes que vous n'avez jamais eus et nous avons pu mentionner des problèmes que vous ne développerez jamais. Tous les patients ne développent pas ces problèmes, mais parce qu'ils peuvent survenir, il est important de poser toutes les questions à tous les patients. Merci de votre temps et de votre attention à compléter ce questionnaire.</p>	

## PARTIE III : EXAMEN MOTEUR

Vue d'ensemble : Cette partie de l'échelle évalue les signes moteurs de la maladie de Parkinson. En administrant la partie III de la MDS-UPDRS, l'investigateur devra respecter les directives suivantes :  
En haut du formulaire, notez si le patient est sous médicament pour traiter les symptômes de la maladie de Parkinson et, s'il est sous lévodopa, à quand remonte la dernière dose.

De même, si le patient reçoit une médication pour traiter les symptômes de la maladie de Parkinson, notez l'état clinique du patient en utilisant les définitions suivantes :

**ON** : état fonctionnel type quand les patients prennent un traitement médical et répondent bien.

**OFF** : état fonctionnel type quand les patients ont une mauvaise réponse malgré le fait qu'ils prennent leurs médicaments.

L'investigateur devra : « évaluer ce que vous voyez ». De l'avis général, des problèmes médicaux simultanés tels qu'un accident vasculaire cérébral, une paralysie, de l'arthrose, une contracture, et des problèmes orthopédiques comme une prothèse de hanche ou d'un genou, et une scoliose, peuvent interférer avec des items individuels dans l'examen moteur. Dans des situations où il est absolument impossible d'évaluer (amputations, paralysie, membre dans un plâtre) utilisez la notation NE pour Non Evaluable. Autrement, évaluer la performance de chaque tâche comme le patient l'exécute dans le contexte des co-morbidités.

Tous les items doivent avoir une note entière (pas de demi-point, pas de score manquant).

Des instructions spécifiques sont données pour l'évaluation de chaque item. Elles devront être suivies dans tous les cas. L'investigateur fait la démonstration pendant qu'il décrit les tâches que le patient doit accomplir, et évalue la fonction immédiatement après. Pour le mouvement spontané global et les items de tremblement de repos (3.14 et 3.17), ces items ont été placés délibérément à la fin de l'échelle car l'information clinique appropriée au score sera obtenue à partir de l'examen entier.

A la fin de l'évaluation, indiquez si la dyskinésie (chorée ou dystonie) était présente au moment de l'examen, et si cela était le cas si ces mouvements ont interféré avec l'examen moteur.

**3a** Le patient reçoit-il des médicaments pour traiter les symptômes de la maladie de Parkinson ?

NON       OUI

**3b** Si le patient reçoit des médicaments pour traiter les symptômes de la maladie de Parkinson, notez l'état clinique du patient en utilisant les définitions suivantes :

ON. ON correspond à l'état fonctionnel type quand les patients reçoivent leur(s) médication(s) et ont une bonne réponse.

OFF. OFF correspond à l'état fonctionnel type quand les patients ont une mauvaise réponse malgré le fait qu'ils prennent des médicaments.

**3c** Le patient est-il sous lévodopa ?       NON       OUI

3.C1 Si oui, minutes écoulées depuis la dernière dose de lévodopa : \_\_\_\_\_

3.1 PAROLE	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Ecoutez le discours libre et fluide du patient et engagez la conversation si nécessaire. Sujets suggérés : renseignez vous sur le métier du patient, sur ses passe-temps favoris, ses exercices ou comment il s'est rendu au cabinet du médecin ? Évaluez le volume, la modulation (prosodie), la clarté, incluant l'articulation, la palilalie (répétitions de syllabes) et la tachyphémie (discours rapide liant les syllabes ensemble).</p> <p>0 : Normal : Pas de problème de parole.</p> <p>1 : Minime : Perte de modulation, de diction ou de volume, mais tous les mots sont encore faciles à comprendre.</p> <p>2 : Léger : Perte de modulation, de diction ou de volume avec quelques mots peu clairs mais la majorité des phrases sont faciles à suivre.</p> <p>3 : Modéré : Le discours est difficile à comprendre à tel point que quelques phrases, mais pas la plupart, sont mal comprises.</p> <p>4 : Sévère : La plupart du discours est difficile à comprendre ou inintelligible.</p>	<input data-bbox="1378 591 1453 663" type="text"/>
<p><b>3.2 EXPRESSION FACIALE</b></p> <p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Observez le patient assis, au repos pendant 10 secondes, sans qu'il parle et aussi pendant qu'il parle. Observez la fréquence du clignement de l'œil, faciès en masque ou la perte d'expression faciale, le sourire spontané et l'intervalle entre les lèvres.</p> <p>0 : Normal : Expression faciale normale.</p> <p>1 : Minime : Faciès en masque minime, seulement manifestés par une diminution de la fréquence du clignement des paupières.</p> <p>2 : Léger : En plus de la diminution de la fréquence du clignement, le faciès en masque est présent dans la partie inférieure du visage, à savoir rareté des mouvements autour de la bouche, tel qu'un amoindrissement du sourire spontané, mais les lèvres ne sont pas séparées.</p> <p>3 : Modéré : Faciès en masque avec quelquefois les lèvres séparées quand la bouche est au repos.</p> <p>4 : Sévère : Faciès en masque avec lèvres séparées la plupart du temps quand la bouche est au repos.</p>	<input data-bbox="1378 1442 1453 1514" type="text"/>

3.3 RIGIDITE	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : La rigidité est jugée sur des mouvements lents et passifs des principales articulations, quand le patient est en position relâchée et que l'investigateur lui manipule les membres et le cou. En premier, testez sans manœuvre d'activation. Testez et évaluez le cou et chaque membre séparément. Pour les bras, testez les articulations du poignet et du coude simultanément. Pour les jambes, testez les articulations de la hanche et du genou simultanément. Si aucune rigidité n'est détectée, utilisez une manœuvre d'activation (de sensibilisation) tel que tapotement des doigts, ouverture et fermeture du poing, ou taper du talon, sur un membre n'étant pas testé. Expliquez au patient d'être aussi relâché que possible puisque vous testez la rigidité.</p> <p>0 : Normal : Pas de rigidité.</p> <p>1 : Minime : Rigidité seulement détectée avec la manœuvre d'activation.</p> <p>2 : Léger : Rigidité détectée sans manœuvre d'activation, mais l'amplitude complète de mobilisation est facilement effectuée.</p> <p>3 : Modéré : Rigidité détectée sans manœuvre d'activation ; l'amplitude complète de mobilisation est effectuée avec effort.</p> <p>4 : Sévère : Rigidité détectée sans manœuvre d'activation et l'amplitude complète de mobilisation n'est pas réalisée.</p>	<p><b>Cou</b></p> <input data-bbox="1374 315 1449 394" type="checkbox"/>  <p><b>ESD</b></p> <input data-bbox="1374 495 1449 573" type="checkbox"/>  <p><b>ESG</b></p> <input data-bbox="1374 685 1449 763" type="checkbox"/>  <p><b>EID</b></p> <input data-bbox="1374 864 1449 943" type="checkbox"/>  <p><b>EIG</b></p> <input data-bbox="1374 1055 1449 1133" type="checkbox"/>
<p><b>3.4 TAPOTEMENT DE DOIGT</b></p> <p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Chaque main est testée séparément. Faites la démonstration de la tâche, mais ne continuez pas à effectuer la tâche pendant que le patient est testé. Donnez au patient l'instruction de tapoter l'index sur le pouce 10 fois aussi rapidement et amplement que possible. Evaluer chaque côté séparément en évaluant la vitesse, l'amplitude, les hésitations, les haltes et la diminution de l'amplitude.</p> <p>0 : Normal : Aucun problème.</p> <p>1 : Minime : N'importe laquelle des situations suivantes : a) le rythme régulier est cassé par une ou deux interruptions ou hésitations du mouvement de tapotement ; b) ralentissement minime ; c) l'amplitude diminue près de la fin des 10 tapotements.</p> <p>2 : Léger : N'importe laquelle des situations suivantes : a) 3 à 5 interruptions pendant le tapotement ; b) léger ralentissement ; c) l'amplitude diminue à la moitié de la séquence des 10 tapotements.</p> <p>3 : Modéré : N'importe laquelle des situations suivantes : a) plus de 5 interruptions pendant le tapotement ou au moins un arrêt prolongé dans le mouvement en cours ; b) ralentissement modéré ; c) l'amplitude diminue commençant dès le premier tapotement.</p> <p>4 : Sévère : Ne peut pas ou peut seulement à peine effectuer la tâche à cause du ralentissement, des interruptions ou des diminutions d'amplitude.</p>	<p><b>ED</b></p> <input data-bbox="1374 1491 1449 1570" type="checkbox"/>  <p><b>EG</b></p> <input data-bbox="1374 1693 1449 1771" type="checkbox"/>

3.5 MOUVEMENTS DE LA MAIN	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Testez chaque main séparément. Faites la démonstration de la tâche mais ne continuez pas à effectuer la tâche pendant que le patient est testé. Donnez au patient l'instruction de fermer le poing, coude plié, de telle sorte que la paume soit face à l'investigateur. Demandez au patient d'ouvrir la main 10 fois aussi amplement et aussi rapidement que possible. Si le patient ne réussit pas à avoir le poing serré ou à ouvrir la main en grand, rappelez lui de le faire. Évaluez chaque côté séparément, en évaluant la vitesse, l'amplitude, les hésitations, les haltes et la diminution de l'amplitude.</p> <p>0 : Normal :           Aucun problème.</p> <p>1 : Minime :           N'importe laquelle des situations suivantes : a) le rythme régulier est cassé par une ou deux interruptions ou hésitations du mouvement ; b) ralentissement minime ; c) l'amplitude diminue près de la fin de la tâche.</p> <p>2 : Léger :            N'importe laquelle des situations suivantes : a) 3 à 5 interruptions pendant les mouvements ; b) léger ralentissement ; c) l'amplitude diminue à la moitié de la tâche.</p> <p>3 : Modéré :           N'importe laquelle des situations suivantes : a) plus de 5 interruptions pendant le mouvement ou au moins un arrêt prolongé (blocage) dans le mouvement en cours ; b) ralentissement modéré ; c) l'amplitude diminue dès la première séquence d'ouverture et de fermeture.</p> <p>4 : Sévère :           Ne peut pas ou peut seulement à peine effectuer la tâche à cause du ralentissement, des interruptions ou des diminutions d'amplitude.</p>	<p style="text-align: center;"><b>ED</b></p> <div style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></div> <p style="text-align: center;"><b>EG</b></p> <div style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></div>
<p><b>3.6 MOUVEMENTS PRONATION ET SUPINATION DES MAINS</b></p> <p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Testez chaque main séparément. Faites la démonstration de la tâche, mais ne continuez pas à effectuer la tâche pendant que le patient est testé. Donnez au patient l'instruction d'étendre le bras devant son corps, paume vers le bas, puis de tourner les paumes de haut en bas, alternativement 10 fois aussi rapidement et amplement que possible. Évaluez chaque côté séparément en évaluant la vitesse, l'amplitude, les hésitations, les haltes et la diminution de l'amplitude.</p> <p>0 : Normal :           Aucun problème.</p> <p>1 : Minime :           N'importe laquelle des situations suivantes : a) le rythme régulier est cassé par une ou deux interruptions ou hésitations du mouvement ; b) ralentissement minime ; c) l'amplitude diminue près de la fin de la séquence.</p> <p>2 : Léger :            N'importe laquelle des situations suivantes : a) 3 à 5 interruptions pendant les mouvements ; b) léger ralentissement ; c) l'amplitude diminue à la moitié de la séquence.</p> <p>3 : Modéré :           N'importe laquelle des situations suivantes : a) plus de 5 interruptions pendant le mouvement ou au moins un arrêt prolongé (blocage) dans le mouvement en cours ; b) ralentissement modéré ; c) l'amplitude diminue commençant dès la première séquence de prono-supination.</p> <p>4 : Sévère :           Ne peut pas ou peut seulement à peine effectuer la tâche à cause du ralentissement, des interruptions ou des diminutions d'amplitude.</p>	<p style="text-align: center;"><b>ED</b></p> <div style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></div> <p style="text-align: center;"><b>EG</b></p> <div style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></div>



3.7 TAPOTEMENT DE L'ORTEIL	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Installez le patient assis dans un fauteuil à dossier droit et accoudoirs, les deux pieds au sol. Testez chaque pied séparément. Faites la démonstration de la tâche, mais ne continuez pas à effectuer la tâche pendant que le patient est testé. Donnez au patient, l'instruction de mettre le talon au sol dans une position confortable, puis de taper les orteils 10 fois aussi amplement et rapidement que possible. Évaluez chaque côté séparément en évaluant la vitesse, l'amplitude, les hésitations, les haltes et la diminution de l'amplitude.</p> <p>0 : Normal :           Aucun problème.</p> <p>1 : Minime :           N'importe laquelle des situations suivantes : a) le rythme régulier est cassé par une ou deux interruptions ou hésitations du mouvement de tapotement ; b) ralentissement minime ; c) l'amplitude diminue près de la fin des 10 tapotements.</p> <p>2 : Léger :            N'importe laquelle des situations suivantes : a) 3 à 5 interruptions pendant les mouvements de tapotement ; b) léger ralentissement ; c) l'amplitude diminue à la moitié de la tâche.</p> <p>3 : Modéré :           N'importe laquelle des situations suivantes : a) plus de 5 interruptions pendant les mouvements de tapotement ou au moins un arrêt prolongé (blocage) dans le mouvement en cours ; b) ralentissement modéré ; c) l'amplitude diminue après le premier tapotement.</p> <p>4 : Sévère :           Ne peut pas ou peut seulement à peine effectuer la tâche à cause du ralentissement, des interruptions ou des diminutions d'amplitude.</p>	<p>ED</p> <p><input type="checkbox"/></p> <p>EG</p> <p><input type="checkbox"/></p>
<p><b>3.8 AGILITE DE LA JAMBE</b></p> <p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Installez le patient assis dans un fauteuil à dossier droit et accoudoirs. Le patient doit avoir les deux pieds confortablement au sol. Testez chaque jambe séparément. Faites la démonstration de la tâche, mais ne continuez pas à effectuer la tâche pendant que le patient est testé. Donnez au patient, l'instruction de mettre le pied au sol dans une position confortable et puis de lever et de taper le pied au sol 10 fois aussi haut et rapidement que possible. Évaluez chaque côté séparément en évaluant la vitesse, l'amplitude, les hésitations, les haltes et la diminution de l'amplitude.</p> <p>0 : Normal :           Aucun problème.</p> <p>1 : Minime :           N'importe laquelle des situations suivantes : a) le rythme régulier est cassé par une ou deux interruptions ou hésitations du mouvement , b) ralentissement minime ; c) l'amplitude diminue vers la fin de la tâche.</p> <p>2 : Léger :            N'importe laquelle des situations suivantes : a) 3 à 5 interruptions pendant les mouvements ; b) léger ralentissement ; c) l'amplitude diminue à la moitié de la tâche.</p> <p>3 : Modéré :           N'importe laquelle des situations suivantes : a) plus de 5 interruptions pendant le mouvement ou au moins un arrêt prolongé (blocage) dans le mouvement en cours ; b) ralentissement modéré de la vitesse ; c) l'amplitude diminue après le premier tapotement.</p> <p>4 : Sévère :           Ne peut pas ou peut seulement à peine effectuer la tâche à cause du ralentissement, des interruptions ou des diminutions d'amplitude.</p>	<p>ED</p> <p><input type="checkbox"/></p> <p>EG</p> <p><input type="checkbox"/></p>

3.9 LEVER DU FAUTEUIL	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Installez le patient assis dans un fauteuil à dossier droit et accoudoirs, les deux pieds au sol et bien enfoncé dans la chaise (si le patient n'est pas trop petit). Demandez au patient de croiser les bras sur la poitrine et puis de se lever. Si le patient ne réussit pas, répétez cet essai jusqu'à un maximum de 2 fois plus. S'il ne réussit toujours pas, autorisez le patient à s'avancer au bord de la chaise pour se lever les bras croisés sur la poitrine. Autorisez seulement un essai dans cette position. S'il ne réussit pas, autorisez le patient à se soulever en s'aidant de ses mains sur les accoudoirs de la chaise. Autorisez un maximum de 3 essais de poussées. S'il ne réussit toujours pas aidez le patient à se lever. Après que le patient soit debout, observez la posture pour l'item 3.13.</p> <p>0 : Normal :           Aucun problème. Capable de se lever rapidement sans hésitation.</p> <p>1 : Minime :           Le lever est plus lent que la normale ; ou peut avoir nécessité plus d'un essai ; ou peut avoir besoin de s'avancer au bord du fauteuil pour se lever. Pas besoin d'utiliser les accoudoirs du fauteuil.</p> <p>2 : Léger :             Se lève en s'aidant des accoudoirs du fauteuil sans difficulté.</p> <p>3 : Modéré :           A besoin de s'aider pour se lever, mais a tendance à tomber en arrière ; ou peut devoir essayer plus d'une fois en utilisant les accoudoirs du fauteuil, mais peut se lever sans aide.</p> <p>4 : Sévère :            Incapable de se lever sans aide.</p>	<input data-bbox="1380 674 1453 748" type="text"/>
<p><b>3.10 MARCHE</b></p> <p><u>Instructions à l'investigateur</u> : On évalue la marche de la meilleure façon en faisant que le patient marche en s'éloignant et puis revienne vers l'investigateur de façon à ce que les deux côtés, droit et gauche du corps, puissent être facilement observés et simultanément. Le patient devra marcher au moins 10 m puis tourner et revenir vers l'investigateur. Cet item mesure des comportements multiples : l'amplitude de la foulée, la vitesse de la foulée, la hauteur à laquelle le pied est soulevé, la frappe du talon pendant la marche, la façon de pivoter, et le ballant des bras, mais non le blocage de la marche (freezing). Évaluez aussi pour « blocage de la marche » (freezing) (item suivant 3.11) pendant que le patient marche. Observez la posture pour l'item 3.13.</p> <p>0 : Normal :           Aucun problème.</p> <p>1 : Minime :           Déambulation autonome avec altération minime de la marche.</p> <p>2 : Léger :             Déambulation autonome mais avec une altération substantielle de la marche.</p> <p>3 : Modéré :           Nécessite un dispositif d'assistance pour une marche sûre (cane, déambulateur), mais pas d'aide humaine.</p> <p>4 : Sévère :            Ne peut pas marcher du tout ou seulement avec l'aide d'une autre personne.</p>	<input data-bbox="1380 1469 1453 1543" type="text"/>

3.11 BLOCAGE DE LA MARCHÉ (FREEZING)	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Pendant l'évaluation de la marche, évaluez aussi la présence d'épisodes de blocage de marche (freezing). Observez l'hésitation au démarrage et les mouvements de piétinements particulièrement au demi-tour et en atteignant la fin de la tâche. Dans la mesure autorisée par leur sécurité, les patients ne peuvent pas utiliser des astuces sensorielles pendant l'évaluation.</p> <p>0 : Normal : Pas de blocage.</p> <p>1 : Minime : Se bloque au démarrage, au demi-tour ou en passant le seuil d'une porte avec un seul arrêt durant n'importe lequel de ces événements, mais ensuite continue de façon unie sans blocage pendant la marche en ligne droite.</p> <p>2 : Léger : Se bloque au démarrage, au demi-tour ou en passant le seuil d'une porte avec plus d'un seul arrêt durant n'importe laquelle de ces activités, mais continue de façon unie sans blocage pendant la marche en ligne droite.</p> <p>3 : Modéré : Se bloque une fois pendant la marche en ligne droite.</p> <p>4 : Sévère : Se bloque plusieurs fois pendant la marche en ligne droite.</p>	<input data-bbox="1390 580 1465 654" type="text"/>
<p><b>3.12 STABILITE POSTURALE</b></p> <p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Le test examine la réaction à un déplacement soudain du corps produit par une poussée rapide et énergique sur les épaules, tandis que le patient est debout, les yeux ouverts, les pieds confortablement séparés et parallèles. Test de rétroimpulsion. Tenez vous derrière le patient et indiquez lui ce qu'il va se passer. Expliquez lui, qu'il ou elle, est autorisé(e) à faire un pas en arrière pour éviter de tomber. Il devrait y avoir un mur solide derrière l'examineur, à au moins 1 ou 2 m de distance pour permettre l'observation du nombre de pas rétroimpulsifs. La première poussée est une démonstration instructionnelle et est intentionnellement plus légère et non évaluée. La deuxième fois, les épaules sont tirés brusquement et énergiquement vers l'investigateur avec assez de force pour déplacer le centre de gravité de telle sorte que le patient DOIT faire un pas en arrière. L'investigateur a besoin d'être près pour rattraper le patient mais doit se tenir suffisamment en arrière de façon à laisser assez de place pour que le patient puisse faire plusieurs pas et retrouver son équilibre. N'autorisez pas le patient à fléchir le corps anormalement en avant pour anticiper l'impact. Observez le nombre de pas vers l'arrière ou la chute. On considère le test comme normal tant que le malade ne fait pas plus de 2 pas (2 pas y compris) en arrière pour retrouver son équilibre, de telle sorte que les évaluations anormales commencent à partir de 3 pas. Si le patient ne comprend pas le test, l'investigateur peut le répéter de façon à ce que son évaluation corresponde à une estimation qu'il considère reflétant les limites du patient, plutôt que son incompréhension du test ou son manque de préparation. Observez la posture debout pour l'item 3.13.</p> <p>0 : Normal : Aucun problème : Retrouve son équilibre avec 1 ou 2 pas.</p> <p>1 : Minime : 3 à 5 pas, mais le sujet retrouve son équilibre sans aide.</p> <p>2 : Léger : Plus de 5 pas, mais le sujet retrouve son équilibre sans aide.</p> <p>3 : Modéré : Tient l'équilibre debout en sécurité, mais avec absence de réponse posturale ; chute s'il n'est pas rattrapé par l'examineur.</p> <p>4 : Sévère : Très instable, tend à perdre l'équilibre spontanément ou juste avec une légère poussée sur les épaules.</p>	<input data-bbox="1390 1561 1465 1635" type="text"/>

3.13 POSTURE	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : La posture est évaluée alors que le patient se tient debout après s'être levé d'une chaise, pendant la marche, et pendant l'examen des réflexes posturaux. Si vous remarquez une mauvaise posture, dites au patient de se tenir droit et voyez si la posture s'améliore (voir option 2 ci-dessous). Évaluez la plus mauvaise posture observée dans ces 3 points. Observez la flexion et la tendance à pencher sur les côtés.</p> <p>0 : Normal :           Aucun problème.</p> <p>1 : Minime :            Ne se tient pas tout à fait droit, mais la posture pourrait être considérée comme normale pour une personne plus âgée.</p> <p>2 : Léger :             Flexion indiscutable, scoliose ou latéro-déviations, mais le patient peut corriger la posture vers une posture normale quand on lui demande de le faire.</p> <p>3 : Modéré :            Posture fléchie, scoliose ou latéro-déviations qui ne peut être corrigée volontairement vers une posture normale par le patient.</p> <p>4 : Sévère :            Flexion, scoliose ou attitude penchée avec une posture extrêmement anormale.</p>	<input data-bbox="1385 607 1461 680" type="text"/>
<p><b>3.14 SPONTANEITE GLOBALE DU MOUVEMENT (bradykinésie corporelle)</b></p> <p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Cette évaluation globale combine toutes les observations sur la lenteur, les hésitations, l'amplitude réduite et la rareté du mouvement en général, incluant une réduction des gestes et du croisement des jambes. Cette observation est fondée sur l'impression globale de l'investigateur après avoir observé des gestes spontanés en position assise, et la nature du lever et de la marche.</p> <p>0 : Normal :            Aucun problème.</p> <p>1 : Minime :            Lenteur globale et pauvreté des mouvements spontanés minimales.</p> <p>2 : Léger :             Lenteur globale et pauvreté des mouvements spontanés légères.</p> <p>3 : Modéré :            Lenteur globale et pauvreté des mouvements spontanés modérées.</p> <p>4 : Sévère :            Lenteur globale et pauvreté des mouvements spontanés sévères.</p>	<input data-bbox="1385 1406 1461 1480" type="text"/>

3.15 TREMBLEMENT POSTURAL DES MAINS	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Tout tremblement incluant la réémergence du tremblement de repos présent dans cette posture, doit être inclus dans cette évaluation. Cotez chaque main séparément. Cotez la plus grande amplitude observée. Donnez l'instruction au patient d'étendre les bras devant son corps, paumes vers le bas. Le poignet doit être droit et les doigts confortablement séparés de sorte qu'ils ne se touchent pas. Observez cette posture pendant 10 secondes.</p> <p>0 : Normal : Pas de tremblement.</p> <p>1 : Minime : Le tremblement est présent mais a moins d'1 cm d'amplitude.</p> <p>2 : Léger : Le tremblement a au moins 1 mais pas plus de 3 cm d'amplitude.</p> <p>3 : Modéré : Le tremblement a au moins 3 mais pas plus de 10 cm d'amplitude.</p> <p>4 : Sévère : Le tremblement a au moins 10 cm d'amplitude.</p>	<p>ED</p> <p><input type="checkbox"/></p> <p>EG</p> <p><input type="checkbox"/></p>
<p><b>3.16 TREMBLEMENT D'ACTION DES MAINS</b></p> <p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Ce test est fondé sur la manœuvre du doigt - nez. Le bras commençant avec la position tendue, faites que le patient exécute au moins 3 manœuvres de doigt - nez avec chaque main, atteignant aussi loin que possible le doigt de l'investigateur. La manœuvre du doigt - nez devra être effectuée assez lentement pour ne cacher aucun tremblement pouvant survenir avec des mouvements de bras très rapide. Répétez avec l'autre main, en évaluant chaque main séparément. Le tremblement peut être présent à travers le mouvement ou alors qu'il a atteint l'une ou l'autre cible (nez ou doigt). Évaluez la plus grande amplitude observée.</p> <p>0 : Normal : Pas de tremblement.</p> <p>1 : Minime : Le tremblement est présent mais inférieur à 1 cm d'amplitude.</p> <p>2 : Léger : Le tremblement a au moins 1 mais pas plus de 3 cm d'amplitude.</p> <p>3 : Modéré : Le tremblement a au moins 3 mais pas plus de 10 cm d'amplitude.</p> <p>4 : Sévère : Le tremblement a au moins 10 cm d'amplitude.</p>	<p>ED</p> <p><input type="checkbox"/></p> <p>EG</p> <p><input type="checkbox"/></p>

3.17 AMPLITUDE DU TREMBLEMENT DE REPOS	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Cet item et le suivant ont été mis intentionnellement à la fin de l'examen afin de permettre à l'évaluateur de rassembler des observations sur le tremblement de repos pouvant apparaître à n'importe quel moment de l'examen, incluant l'attitude tranquillement assise du patient, la marche et toutes les activités pendant lesquelles certaines parties du corps sont en mouvement, mais d'autres sont au repos. Cotez l'amplitude maximum observée à n'importe quel moment en tant que score final. Cotez seulement l'amplitude et non la persistance ou l'intermittence du tremblement.</p>	
<p>Dans le cadre de cette évaluation, le patient devra être tranquillement assis dans un fauteuil, les mains sur les accoudoirs (et non sur les genoux), et les pieds confortablement posés au sol pendant 10 secondes sans aucune autre directive. Le tremblement de repos est évalué séparément pour les 4 membres et aussi pour l'ensemble lèvre / mâchoire. Évaluez seulement l'amplitude maximum observée à n'importe quel moment en tant qu'évaluation finale.</p>	
<p><i>Evaluation des extrémités :</i></p>	
<p>0 : Normal : Pas de tremblement.</p>	<p><b>ESD</b> <input type="checkbox"/></p>
<p>1 : Minime : &lt; 1 cm en amplitude maximale.</p>	
<p>2 : Léger : ≥ à 1 cm mais &lt; à 3 cm en amplitude maximale.</p>	<p><b>ESG</b> <input type="checkbox"/></p>
<p>3 : Modéré : ≥ 3 cm mais &lt; à 10 cm en amplitude maximale.</p>	
<p>4 : Sévère : ≥ à 10 cm en amplitude maximale.</p>	<p><b>EID</b> <input type="checkbox"/></p>
<p><i>Evaluation pour la lèvre/la mâchoire :</i></p>	
<p>0 : Normal : pas de tremblement.</p>	<p><b>EIG</b> <input type="checkbox"/></p>
<p>1 : Minime : &lt; 1 cm en amplitude maximale.</p>	
<p>2 : Léger : ≥ à 1 cm mais &lt; à 2 cm en amplitude maximale.</p>	<p><b>lèvre, mâchoire</b> <input type="checkbox"/></p>
<p>3 : Modéré : ≥ 2 cm mais &lt; à 3 cm en amplitude maximale.</p>	
<p>4 : Sévère : ≥ à 3 cm en amplitude maximale.</p>	<p><input type="checkbox"/></p>

3.18 CONSTANCE DU TREMBLEMENT DE REPOS	SCORE
<p><u>Instructions à l'investigateur</u> : Cet item reçoit une seule évaluation pour tout le tremblement de repos et se focalise sur la constance du tremblement de repos pendant la période de l'examen quand les différentes parties du corps sont au repos. Il est coté délibérément à la fin de l'examen de telle sorte que plusieurs minutes d'information peuvent être regroupées dans la cotation.</p> <p>0 : Normal : Pas de tremblement.</p> <p>1 : Minime : Le tremblement de repos est présent, inférieur ou égale à 25 % de la période entière de l'examen.</p> <p>2 : Léger : Le tremblement de repos est présent, entre 26-50% de la période entière de l'examen.</p> <p>3 : Modéré : Le tremblement de repos est présent, entre 51 à 75 % de la période entière de l'examen.</p> <p>4 : Sévère : Le tremblement de repos est présent, plus de 75 % de la période entière de l'examen.</p>	<input data-bbox="1393 573 1465 647" type="checkbox"/>
<p><b>RETENTISSEMENT DES DYSKINESIES SUR LES EVALUATIONS DE LA PARTIE III</b></p> <p>A. Des dyskinésies (chorée ou dystonie) étaient-elles présentes pendant l'examen ?  <input type="checkbox"/> NON      <input type="checkbox"/> OUI</p> <p>B. Si oui, ces mouvements ont-ils interféré avec vos évaluations ?  <input type="checkbox"/> NON      <input type="checkbox"/> OUI</p> <p><b>ECHELLE HOEHN &amp; YAHR</b></p> <p>0 : Asymptomatique.</p> <p>1 : Implication unilatérale seulement.</p> <p>2 : Implication bilatérale sans perte d'équilibre.</p> <p>3 : Implication légère à modérée ; instabilité posturale mais physiquement autonome ; a besoin d'assistance pour récupérer du test de pulsion.</p> <p>4 : Incapacité sévère ; encore capable de marcher ou de tenir debout sans assistance.</p> <p>5 : Obligé à être dans une chaise roulante ou alité à moins d'être aidé(e).</p>	<input data-bbox="1393 1330 1465 1404" type="checkbox"/>

## PARTIE IV : COMPLICATIONS MOTRICES

Vue d'ensemble et instructions : Dans cette section, l'évaluateur utilise une information historique et objective pour évaluer deux complications motrices, les dyskinésies et les fluctuations motrices incluant la dystonie en état OFF. Utilisez toutes les informations venant du patient, de l'aidant, et de l'examen pour répondre aux 6 questions qui résument la fonction au cours de la semaine précédente incluant aujourd'hui. Comme dans les autres sections, cotez seulement avec une note entière (pas de demi-points autorisés) et ne laissez pas de scores manquants. Si l'item ne peut être évalué, notez NE pour Non Evaluable. Vous aurez besoin de choisir des réponses fondées sur des pourcentages, et de ce fait vous aurez besoin d'établir combien d'heures sont généralement des « heures éveillées » et vous utiliserez ce chiffre comme dénominateur pour le temps OFF et les dyskinésies. Pour la « dystonie OFF », le temps total en « OFF » sera le dénominateur. Définitions opérationnelles pour l'usage de l'examinateur.

Dyskinésies : Ce sont des mouvements involontaires au hasard.

Les mots que les patients utilisent souvent pour les dyskinésies sont : « secousses irrégulières, dandinement, mouvements saccades ». Il est essentiel de bien montrer au patient la différence entre les dyskinésies et le tremblement, une erreur commune quand les patients évaluent les dyskinésies.

Dystonie : Posture déformée, avec souvent une composante en torsion.

Les mots que les patients utilisent souvent pour la dystonie sont : « spasmes, crampes, posture ».

Fluctuation motrice : Réponse variable aux médicaments antiparkinsoniens.

Les mots que les patients utilisent souvent pour fluctuation motrice sont : « épuisement de l'effet ou de la réponse, effet de montagne russe, ON/OFF, effet de médicaments inégaux ».

OFF : Etat fonctionnel type durant lequel les patients ont une mauvaise réponse malgré la prise de médicaments ou réponse fonctionnelle type quand les malades ne prennent AUCUN traitement pour le Parkinson. Les mots que les patients utilisent souvent sont : « baisse de régime, période difficile, période de tremblement, période ralentie, période où mes remèdes ne marchent pas ».

ON : Etat fonctionnel type durant lequel les patients sont traités et ont une bonne réponse. Les mots que les patients utilisent souvent sont : « bonne période, période de marche, période où mes remèdes marchent ».



**A – DYSKINESIES [à l'exclusion de la période OFF de dystonie]**

**SCORE**

**4.1 TEMPS PASSE AVEC DES DYSKINESIES**

Instructions à l'investigateur : Déterminez les heures habituelles d'éveil pendant la journée et puis les heures de dyskinésies. Calculez le pourcentage. Si le patient a des dyskinésies durant la consultation, vous pouvez les lui signaler comme référence pour vous assurer que les patients et les aidants comprennent ce qu'ils sont en train d'évaluer. Vous pouvez aussi utiliser vos propres compétences d'interprétation pour représenter les mouvements dyskinétiques que vous avez vu précédemment chez le patient, ou leur montrer des mouvements dyskinétiques types vus sur d'autres patients. Excluez de cette question la dystonie douloureuse du matin et de la nuit.

Instructions au patient [et à l'aidant] : Au cours de la semaine précédente, combien d'heures dormez vous habituellement sur une base quotidienne, en incluant le sommeil nocturne et la sieste diurne ? D'accord, si vous dormez \_\_\_ heures, vous êtes éveillé(e) \_\_\_ heures. Durant ces heures d'éveil, combien d'heures au total avez-vous de dandinement, de mouvements saccadiques ou avec secousses ? Ne comptez pas les périodes où vous avez des tremblements, qui est une secousse régulière d'arrière en avant, ou les périodes vous avez des crampes douloureuses au pied ou des spasmes tôt le matin, ou pendant la nuit. Je vous demanderai de m'en parler plus tard. Concentrez-vous seulement sur ces types de dandinement, de mouvements saccadiques ou avec secousses. Additionnez toutes les heures éveillées pendant la journée durant lesquelles ceux-ci surviennent habituellement. Combien d'heures \_\_\_ (utilisez ce nombre pour votre calcul).

- 0 : Normal : Pas de dyskinésies.
- 1 : Minime : ≤ 25% du temps éveillé dans la journée.
- 2 : Léger : De 26% à 50% du temps éveillé dans la journée.
- 3 : Modéré : 51 à 75 % du temps éveillé dans la journée.
- 4 : Sévère : > 75 % du temps éveillé dans la journée.

- 1 - Total des heures éveillées \_\_\_\_\_
- 2 - Total des heures avec dyskinésies \_\_\_\_\_
- 3 - % de dyskinésies = ((2/1)\*100) : \_\_\_\_\_

## 4.2 RETENTISSEMENT FONCTIONNEL DES DYSKINESIES

SCORE

Instructions à l'investigateur : Déterminez le degré de retentissement que les dyskinésies ont sur la fonction quotidienne du patient en terme d'activités et d'interactions sociales. Utilisez la réponse du patient et de l'aidant à vos questions et vos propres observations pendant la visite en consultation pour arriver à la meilleure réponse.

Instructions au patient [et à l'aidant] : *Au cours de la semaine précédente, avez-vous eu des problèmes en faisant des choses ou en étant avec des gens lorsque ces mouvements saccadés apparaissaient ? Vous ont-ils empêché de faire des choses ou d'être avec des gens ?*

- 0 : Normal : Pas de dyskinésies ou pas de retentissement des dyskinésies sur les activités et les interactions sociales.
- 1 : Minime : Les dyskinésies retentissent sur quelques activités, mais le patient effectue habituellement toutes les activités et participe à toutes les interactions de la vie sociale pendant les périodes dyskinétiques.
- 2 : Léger : Les dyskinésies retentissent sur beaucoup d'activités, mais le patient effectue habituellement toutes les activités et participe à toutes les interactions de la vie sociale pendant les périodes dyskinétiques.
- 3 : Modéré : Les dyskinésies retentissent sur les activités au point que le patient ne peut effectuer habituellement certaines activités ou ne peut habituellement pas participer à certaines activités sociales pendant les épisodes dyskinétiques.
- 4 : Sévère : Les dyskinésies retentissent sur la fonction au point que le patient ne peut effectuer la plupart des activités ou participer à la plupart des interactions sociales pendant les épisodes dyskinétiques.

## B- FLUCTUATIONS MOTRICES

SCORE

### 4.3 DUREE DES PERIODES OFF

Instructions à l'investigateur : Utilisez le nombre d'heures éveillées provenant de 4.1 et déterminez les heures passées en condition OFF. Calculez le pourcentage. Si le patient a un épisode OFF durant la consultation, vous pouvez vous appuyer sur cet état comme référence. Vous pouvez aussi utiliser votre connaissance du patient pour décrire une période OFF typique. De plus, vous pouvez aussi utiliser vos propres compétences d'interprétation pour représenter une période OFF déjà vue auparavant chez le patient, ou leur montrer la fonction OFF typique d'autres patients. Notez le nombre type d'heures OFF, car vous aurez besoin de ce nombre pour compléter le 4.6.

Instructions au patient [et à l'aidant] : Certains patients atteints de la maladie de Parkinson retirent un bon effet de leurs médicaments pendant les heures éveillées et nous appelons cela la période ON. D'autres patients prennent leurs médicaments mais ont encore quelques heures de baisse de régime, de période mauvaise, ralentie ou période de tremblement. Les médecins appellent ces mauvaises périodes, période OFF. Au cours de la semaine précédente, vous m'avez dit auparavant que vous êtes généralement éveillé \_\_\_\_\_ heures par jour. Durant ces heures éveillées, combien d'heures au total avez-vous habituellement ce type de baisse régime ou épisode OFF \_\_\_\_ (utilisez ce nombre pour vos calculs).

- 0 : Normal : Pas de période OFF.
- 1 : Minime : ≤ 25% du temps éveillé dans la journée.
- 2 : Léger : 26% à 50% du temps éveillé dans la journée.
- 3 : Modéré : 51 à 75 % du temps éveillé dans la journée.
- 4 : Sévère : > à 75 % du temps éveillé dans la journée.

1 - Total des heures éveillées \_\_\_\_\_  
2 - Total des heures avec OFF \_\_\_\_\_  
3 - % de OFF =  $((2/1)*100)$  : \_\_\_\_\_

#### 4.4 RETENTISSEMENT FONCTIONNEL DES FLUCTUATIONS

SCORE

Instructions à l'investigateur : Déterminez le degré de retentissement que les fluctuations motrices ont sur le fonctionnement quotidien du patient en terme d'activités et d'interactions sociales. Cette question se concentre sur la différence entre l'état ON et l'état OFF. Si le patient n'a pas de période OFF, l'évaluation doit être 0, mais si les patients ont de très légères fluctuations, il est encore possible de coter 0 sur cet item s'il n'y a pas de retentissement sur leurs activités. Utilisez la réponse du patient et de l'aidant à votre question et votre propre observation pendant la visite en consultation pour arriver à la meilleure réponse.

Instructions au patient [et à l'aidant] : Réfléchissez à quel moment ces baisses de régime ou périodes OFF sont survenues au cours de la semaine précédente. Avez-vous habituellement plus de problème à faire les choses ou à être avec des gens par rapport au reste de la journée lorsque vous sentez que vos médicaments marchent bien ? Y-a-t-il certaines choses que vous faites habituellement pendant une bonne période, qui vous posent des problèmes ou que vous arrêtez de faire pendant une période de baisse de régime ?

- 0 : Normal : Pas de fluctuation ou pas de retentissement des fluctuations sur l'accomplissement des activités ou des interactions sociales.
- 1 : Minime : Les fluctuations retentissent sur quelques activités, mais pendant la période OFF, le patient accomplit habituellement toutes les activités et participe à toutes les interactions sociales qui surviennent typiquement pendant la période ON.
- 2 : Léger : Les fluctuations retentissent sur beaucoup d'activités, mais pendant la période OFF, le patient accomplit encore habituellement toutes les activités et participe à toutes les interactions sociales qui surviennent typiquement pendant la période ON.
- 3 : Modéré : Les fluctuations retentissent sur la réalisation des activités pendant la période OFF au point que le patient n'accomplit habituellement pas certaines activités ou ne participe pas à certaines interactions sociales qui sont effectuées durant les périodes ON.
- 4 : Sévère : Les fluctuations retentissent sur le fonctionnement au point que durant la période OFF le patient n'accomplit habituellement pas la plupart des activités, ni ne participe à la plupart des interactions sociales qui sont effectuées pendant les périodes ON.

#### 4.5 COMPLEXITE DES FLUCTUATIONS MOTRICES

SCORE

Instructions à l'investigateur : Déterminez la prévisibilité habituelle des épisodes OFF, qu'ils soient dus à la dose, au moment de la journée, à la prise de nourriture ou à d'autres facteurs. Utilisez l'information fournie par le patient et les aidants et complétez avec vos propres observations. Vous demanderez si le patient peut s'attendre à ce qu'elles arrivent toujours à une période précise, survenant la plupart du temps à un moment particulier (dans ce cas là, vous évaluerez d'avantage pour séparer minime de léger), ou à ce qu'elles arrivent quelquefois à un moment précis ou si elles sont totalement imprévisibles ? En réduisant le pourcentage, vous obtiendrez la réponse correcte.

Instructions au patient [et à l'aidant] : Pour certains patients, les périodes mauvaises ou OFF arrivent à certains moments de la journée ou quand ils sont engagés dans des activités comme manger ou faire de l'exercice. Au cours de la semaine précédente, savez-vous habituellement quand vos périodes mauvaises vont survenir ? En d'autres mots, est-ce que vos baisses de régime apparaissent toujours à un moment donné ? Apparaissent-elles le plus souvent à un moment donné ? Apparaissent-elles seulement quelquefois à un moment donné ? Vos baisses de régime sont-elles totalement imprévisibles ?

- 0 : Normal : Pas de fluctuation motrice.
- 1 : Minime : Les périodes OFF sont prévisibles tout ou presque tout le temps (> à 75 %).
- 2 : Léger : Les périodes OFF sont prévisibles la plupart du temps (51-75%).
- 3 : Modéré : Les périodes OFF sont prévisibles quelquefois (26-50%).
- 4 : Sévère : Les périodes OFF sont rarement prévisibles (≤ à 25 %).

### C- DYSTONIE OFF

SCORE

#### 4.6 DYSTONIE DOULOUREUSE EN ETAT OFF

Instructions à l'investigateur : Pour les patients qui ont des fluctuations motrices, déterminez dans quelle proportion des épisodes OFF comprennent habituellement une dystonie douloureuse ? Vous avez déjà déterminé le nombre d'heures en période OFF (4.3). Parmi ces heures, déterminez combien d'entre-elles sont associées à une dystonie et calculez le pourcentage. S'il n'y a pas de période OFF, notez 0.

Instructions au patient [et à l'aidant] : Dans une question que je vous ai posé(e) précédemment, vous dites avoir généralement \_\_\_\_ d'heures de période mauvaise ou de temps « OFF » quand votre maladie de Parkinson est mal contrôlée. Pendant ces périodes mauvaises ou OFF, avez-vous habituellement des crampes ou des spasmes douloureux ? Sur un total de \_\_\_\_ heures de cette période mauvaise, si vous ajoutez tous les moments de la journée durant lesquels ces crampes douloureuses apparaissent, combien d'heures cela ferait-il ?

0 : Normal : Pas de dystonie ou PAS DE PERIODE OFF.

1 : Minime : ≤ 25% du temps en état OFF.

2 : Léger : 26% à 50% du temps en état OFF.

3 : Modéré : 51 à 75 % du temps en état OFF.

4 : Sévère : > à 75 % du temps en état OFF.

1 - Total des heures OFF \_\_\_\_\_  
2 - Total des heures OFF avec dystonie \_\_\_\_\_  
3 - % de dystonie OFF = ((2/1)\*100) : \_\_\_\_\_

#### Résumé exposé au patient : A LIRE AU PATIENT.

Ceci complète mon évaluation de votre maladie de Parkinson. J'ai conscience que les questions et les tâches ont pris plusieurs minutes, mais je voulais être complet et couvrir toutes les possibilités. En faisant cela, j'ai pu vous interroger sur des problèmes que vous n'avez jamais eu et j'ai pu en mentionner que vous ne développerez jamais. Tous les patients ne développent pas tous ces problèmes, mais parce qu'ils peuvent survenir, il est important de poser toutes les questions à chaque patient. Merci de votre temps et de votre attention en complétant cette échelle avec moi.

Nom du patient	Identification du site	Date de l'évaluation	Initiales de l'investigateur

## MDS UPDRS : Table Sommaire

1.A	Source principale d'information :	<input type="checkbox"/> Patient <input type="checkbox"/> Aidant <input type="checkbox"/> Patient et aidant	3.3b	Rigidité – ESD	
			3.3c	Rigidité – ESG	
<b>Partie I</b>			3.3d	Rigidité – EID	
1.1	Altération cognitive		3.3e	Rigidité – EIG	
1.2	Hallucinations et psychose		3.4a	Tapotement de doigt - ED	
1.3	Humeur dépressive		3.4b	Tapotement de doigt - EG	
1.4	État anxieux		3.5a	Mouvements de la main - ED	
1.5	Apathie		3.5b	Mouvements de la main - EG	
1.6	Signes de syndrome de dysrégulation dopaminergique		3.6a	Mouvements pronation et supination des mains - ED	
1.6a	Qui remplit ce questionnaire ?	<input type="checkbox"/> Patient <input type="checkbox"/> Aidant <input type="checkbox"/> Patient et aidant	3.6b	Mouvements pronation et supination des mains - EG	
			3.7a	Tapotement de l'orteil - ED	
1.7	Problèmes de sommeil		3.7b	Tapotement de l'orteil - EG	
1.8	Somnolence diurne		3.8a	Agilité de la jambe - ED	
1.9	Douleur et autres sensations		3.8b	Agilité de la jambe - EG	
1.10	Problèmes urinaires		3.9	Lever du fauteuil	
1.11	Problèmes de constipation		3.10	Marche	
1.12	Sensation de tête vide au lever		3.11	Blocage de la marche (freezing)	
1.13	Fatigue		3.12	Stabilité posturale	
<b>Partie II</b>			3.13	Posture	
2.1	Parole (élocution)		3.14	Spontanéité globale du mouvement (bradykinésie corporelle)	
2.2	Salivation et fait de baver		3.15a	Tremblement postural des mains – ED	
2.3	Mastication et déglutition		3.15b	Tremblement postural des mains – EG	
2.4	Tâches alimentaires		3.16a	Tremblement d'action des mains – ED	
2.5	Habillage		3.16b	Tremblement d'action des mains – EG	
2.6	Hygiène		3.17a	Amplitude du tremblement de repos – ESD	
2.7	Écriture		3.17b	Amplitude du tremblement de repos – ESG	
2.8	Passe-temps favoris et autres activités		3.17c	Amplitude du tremblement de repos – EID	
2.9	Se tourner dans le lit		3.17d	Amplitude du tremblement de repos – EIG	
2.10	Tremblement		3.17e	Amplitude du tremblement de repos – lèvre, mâchoire	
2.11	Sortir du lit, d'une voiture, d'un siège profond		3.18	Constance du tremblement de repos	
2.12	Marche et équilibre			Des dyskinésies (chorée ou dystonie) étaient-elles présentes pendant l'examen?	<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui
2.13	Blocages à la marche (freezing)			Si oui, ces mouvements ont-ils interféré avec vos évaluations?	<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui
3a	Le patient reçoit-il des médicaments pour traiter les symptômes de la maladie de Parkinson?	<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui		Echelle Hoehn & Yahr	
3b	Etat clinique du patient	<input type="checkbox"/> On <input type="checkbox"/> Off	<b>Partie IV</b>		
3c	Le patient est-il sous lévodopa?	<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui	4.1	Temps passé avec des dyskinésies	
3.C1	Si oui, minutes écoulées depuis la dernière dose de lévodopa		4.2	Retentissement fonctionnel des dyskinésies	
<b>Partie III</b>			4.3	Durée des périodes Off	
3.1	Parole		4.4	Retentissement fonctionnel des fluctuations	
3.2	Expression faciale		4.5	Complexité des fluctuations motrices	
3.3a	Rigidité - cou		4.6	Dystonie douloureuse en état Off	

## Annexe 2: Critères MDS-PD

**TABLE 1.** MDS Clinical Diagnostic Criteria for PD—Executive Summary/Completion Form

The first essential criterion is parkinsonism, which is defined as bradykinesia, in combination with at least 1 of rest tremor or rigidity. Examination of all cardinal manifestations should be carried out as described in the MDS—Unified Parkinson Disease Rating Scale.<sup>30</sup> Once parkinsonism has been diagnosed:

Diagnosis of **Clinically Established PD** requires:

1. Absence of absolute exclusion criteria
2. At least two supportive criteria, and
3. No red flags

Diagnosis of **Clinically Probable PD** requires:

1. Absence of absolute exclusion criteria
2. Presence of red flags counterbalanced by supportive criteria
  - If 1 red flag is present, there must also be at least 1 supportive criterion
  - If 2 red flags, at least 2 supportive criteria are needed
  - No more than 2 red flags are allowed for this category

### Supportive criteria

(Check box if criteria met)

- 1. Clear and dramatic beneficial response to dopaminergic therapy. During initial treatment, patient returned to normal or near-normal level of function. In the absence of clear documentation of initial response a dramatic response can be classified as:
  - a) Marked improvement with dose increases or marked worsening with dose decreases. Mild changes do not qualify. Document this either objectively (>30% in UPDRS III with change in treatment), or subjectively (clearly-documented history of marked changes from a reliable patient or caregiver).
  - b) Unequivocal and marked on/off fluctuations, which must have at some point included predictable end-of-dose wearing off.
- 2. Presence of levodopa-induced dyskinesia
- 3. Rest tremor of a limb, documented on clinical examination (in past, or on current examination)
- 4. The presence of either olfactory loss or cardiac sympathetic denervation on MIBG scintigraphy

**Absolute exclusion criteria:** The presence of any of these features rules out PD:

- 1. Unequivocal cerebellar abnormalities, such as cerebellar gait, limb ataxia, or cerebellar oculomotor abnormalities (eg, sustained gaze evoked nystagmus, macro square wave jerks, hypermetric saccades)
- 2. Downward vertical supranuclear gaze palsy, or selective slowing of downward vertical saccades
- 3. Diagnosis of probable behavioral variant frontotemporal dementia or primary progressive aphasia, defined according to consensus criteria<sup>31</sup> within the first 5 y of disease
- 4. Parkinsonian features restricted to the lower limbs for more than 3 y
- 5. Treatment with a dopamine receptor blocker or a dopamine-depleting agent in a dose and time-course consistent with drug-induced parkinsonism
- 6. Absence of observable response to high-dose levodopa despite at least moderate severity of disease
- 7. Unequivocal cortical sensory loss (ie, graphesthesia, stereognosis with intact primary sensory modalities), clear limb ideomotor apraxia, or progressive aphasia
- 8. Normal functional neuroimaging of the presynaptic dopaminergic system
- 9. Documentation of an alternative condition known to produce parkinsonism and plausibly connected to the patient's symptoms, or, the expert evaluating physician, based on the full diagnostic assessment feels that an alternative syndrome is *more likely* than PD

### Red flags

- 1. Rapid progression of gait impairment requiring regular use of wheelchair within 5 y of onset
- 2. A complete absence of progression of motor symptoms or signs over 5 or more y unless stability is related to treatment
- 3. Early bulbar dysfunction: severe dysphonia or dysarthria (speech unintelligible most of the time) or severe dysphagia (requiring soft food, NG tube, or gastrostomy feeding) within first 5 y
- 4. Inspiratory respiratory dysfunction: either diurnal or nocturnal inspiratory stridor or frequent inspiratory sighs
- 5. Severe autonomic failure in the first 5 y of disease. This can include:
  - a) Orthostatic hypotension<sup>32</sup>—orthostatic decrease of blood pressure within 3 min of standing by at least 30 mm Hg systolic or 15 mm Hg diastolic, in the absence of dehydration, medication, or other diseases that could plausibly explain autonomic dysfunction, or
  - b) Severe urinary retention or urinary incontinence in the first 5 y of disease (excluding long-standing or small amount stress incontinence in women), that is not simply functional incontinence. In men, urinary retention must not be attributable to prostate disease, and must be associated with erectile dysfunction
- 6. Recurrent (>1/y) falls because of impaired balance within 3 y of onset
- 7. Disproportionate anterocollis (dystonic) or contractures of hand or feet within the first 10 y
- 8. Absence of any of the common nonmotor features of disease despite 5 y disease duration. These include sleep dysfunction (sleep-maintenance insomnia, excessive daytime somnolence, symptoms of REM sleep behavior disorder), autonomic dysfunction (constipation, daytime urinary urgency, symptomatic orthostasis), hyposmia, or psychiatric dysfunction (depression, anxiety, or hallucinations)
- 9. Otherwise-unexplained pyramidal tract signs, defined as pyramidal weakness or clear pathologic hyperreflexia (excluding mild reflex asymmetry and isolated extensor plantar response)
- 10. Bilateral symmetric parkinsonism. The patient or caregiver reports bilateral symptom onset with no side predominance, and no side predominance is observed on objective examination

### Criteria Application:

1. Does the patient have parkinsonism, as defined by the MDS criteria? Yes  No   
If no, *neither* probable PD nor clinically established PD can be diagnosed. *If yes:*
2. Are any absolute exclusion criteria present? Yes  No   
If "yes," *neither* probable PD nor clinically established PD can be diagnosed. *If no:*
3. Number of red flags present \_\_\_\_\_
4. Number of supportive criteria present \_\_\_\_\_
5. Are there at least 2 supportive criteria *and* no red flags? Yes  No   
If yes, patient meets criteria for **clinically established PD**. *If no:*
6. Are there more than 2 red flags? Yes  No   
If "yes," probable PD *cannot* be diagnosed. *If no:*
7. Is the number of red flags equal to, or less than, the number of supportive criteria? Yes  No   
If yes, patient meets criteria for **probable PD**



## Metabolic dysregulation in serum predicts compulsive alcohol use: a preclinical study.

Au cours de mon doctorat, j'ai également réalisé une étude satellite en collaboration avec Raphael Goutaudier, également doctorant dans l'équipe travaillant sur l'implication de la voie nigrostriée dans les troubles compulsifs lié à l'usage de l'alcool.

Lors d'une approche expérimentale réalisée sur des rats sauvages exposés à l'alcool, nous avons utilisé la métabolomique afin de déterminer s'il était possible de développer un biomarqueur sanguin permettant de détecter les animaux susceptibles de développer un comportement compulsif associé à l'usage d'alcool. Des prises de sang ont ainsi été réalisées à la suite d'une procédure d'accès intermittent à l'alcool entraînant une consommation excessive, puis après une semaine de sevrage et, finalement, suite à une expérience d'auto-administration couplée à des chocs électriques révélant le comportement de type compulsif de certains animaux. Ces échantillons sanguins ont ensuite été préparés et analysés en suivant la même procédure que lors de chacune de nos expériences.

Ces analyses ont permis de mettre en évidence des dérégulations spécifiques conduisant à la construction d'un biomarqueur composite sur la base de 5 métabolites (créatine, glycine, acétoacétate, tyrosine, arginine). De façon intéressante, ce biomarqueur permet la détection, dès la phase de sevrage, des animaux susceptibles de développer un comportement compulsif parmi des « consommateurs excessifs ». Le manuscrit étant en début de préparation, je ne présenterai que l'abstract et les figures légendées.

# **Metabolic dysregulation in serum predicts compulsive alcohol use: a preclinical study.**

**Authors:** R. Goutaudier\*, D. Mallet\*, M. Bartolomucci, F. Fauvelle, S. Boulet, S. Carnicella

## **Affiliations:**

<sup>1</sup>Inserm, U1216, Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

\*Co-first and Corresponding author. Email: [raphael.goutaudier@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:raphael.goutaudier@univ-grenoble-alpes.fr) and [david.mallet@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:david.mallet@univ-grenoble-alpes.fr)

## **Abstract:**

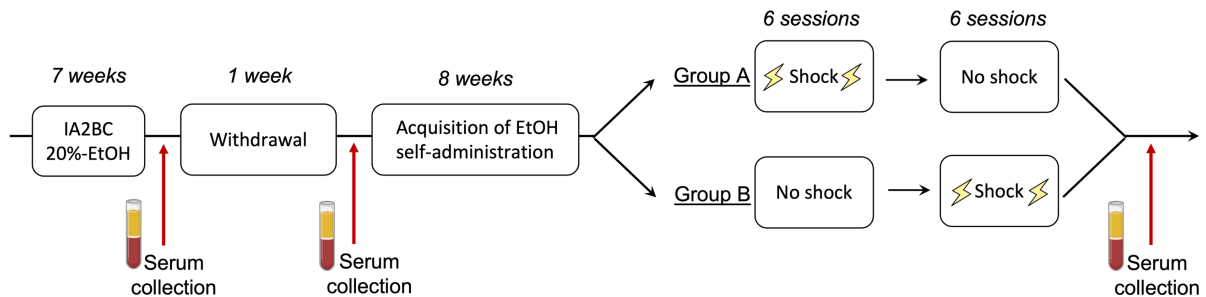
*Background:* Alcohol use disorder (AUD) is a chronic relapsing disorder characterized by compulsive seeking and drinking of high amount of alcohol, despite negative consequences. While most individuals seek and take alcohol in a recreational way, a small proportion of individuals develop AUD. These individuals remain extremely difficult to identify prior the appearance of severe negative consequences. Therefore, a better detection of these patients, early during withdrawal, would allow a faster care, with a greater efficiency and with a much higher chance of success. In this preclinical study, we have investigated potential metabolomic changes during withdrawal associated with compulsive alcohol-related behavior.

*Methods:* Rats were train to consume high level of alcohol in an intermittent-access two-bottle-choice drinking paradigm. They were then submitted to a withdrawal period of one week. Thereafter, rats were train to seek and take alcohol in an operant ethanol self-administration task. At the end of the training, lever presses were coupled to intermittent footshocks to identify rats that compulsively use alcohol despite negative consequences. At the end of each phase, we investigated serum samples using NMR-based metabolomics and data were submitted to advanced multivariate statistics.

*Results:* Comparison of metabolic profile of compulsive, non-compulsive and animals that were not exposed to alcohol during withdrawal highlighted significant serum metabolic differences between each population. Importantly, based on these data, we were able to build a composite biomarker with a combination of 5 metabolites (Creatine, Glycine, Acetoacetate, Tyrosine, Arginine), which allowed to detect rats that will develop compulsivity from others with an accuracy higher than 87%.

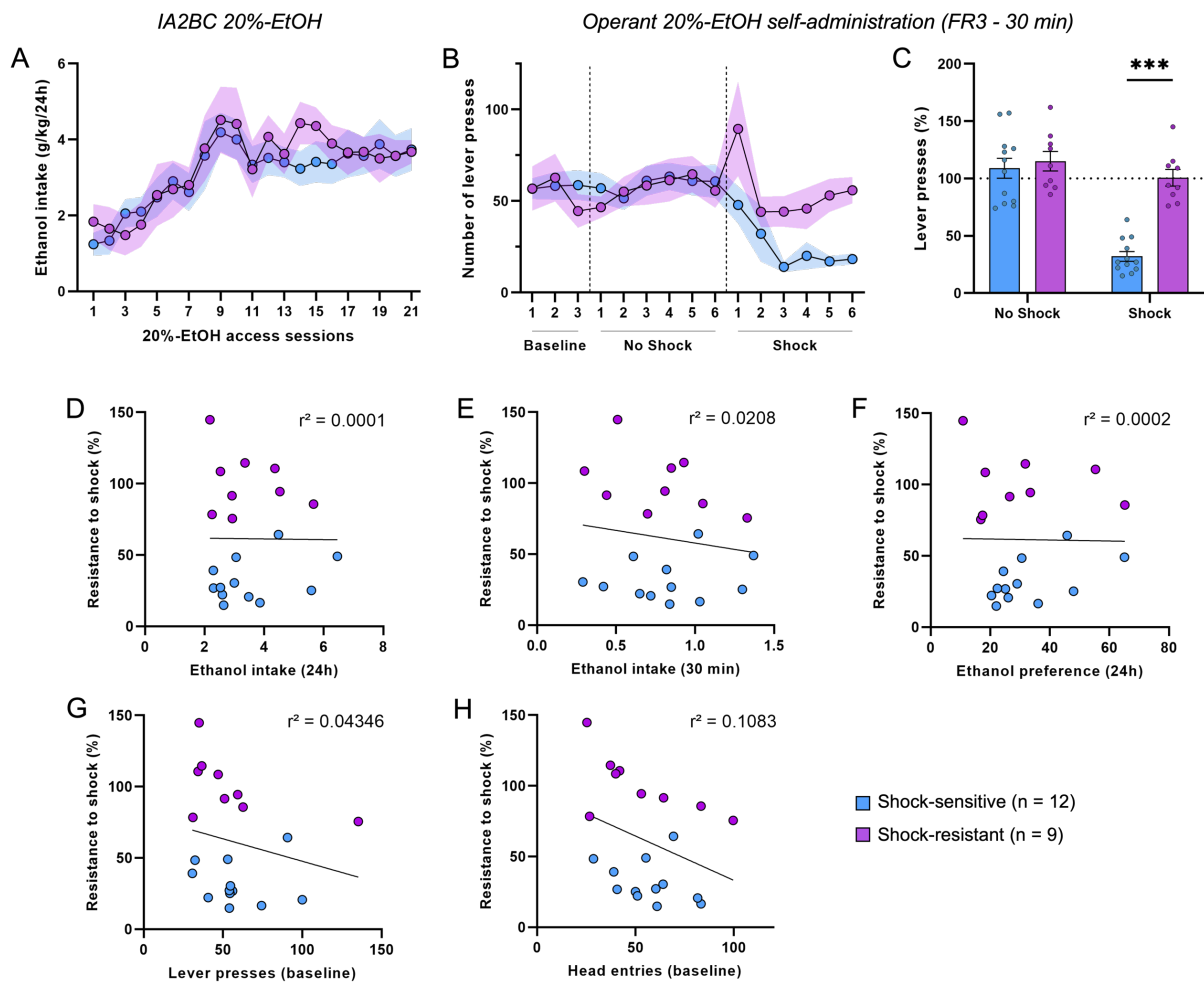
*Conclusion:* From this preclinical study, we propose a promising composite biomarker to identify, early in withdrawal, individuals at risk to develop compulsive alcohol-related behavior.

## Results



**Figure 1: Experimental timeline and design.**

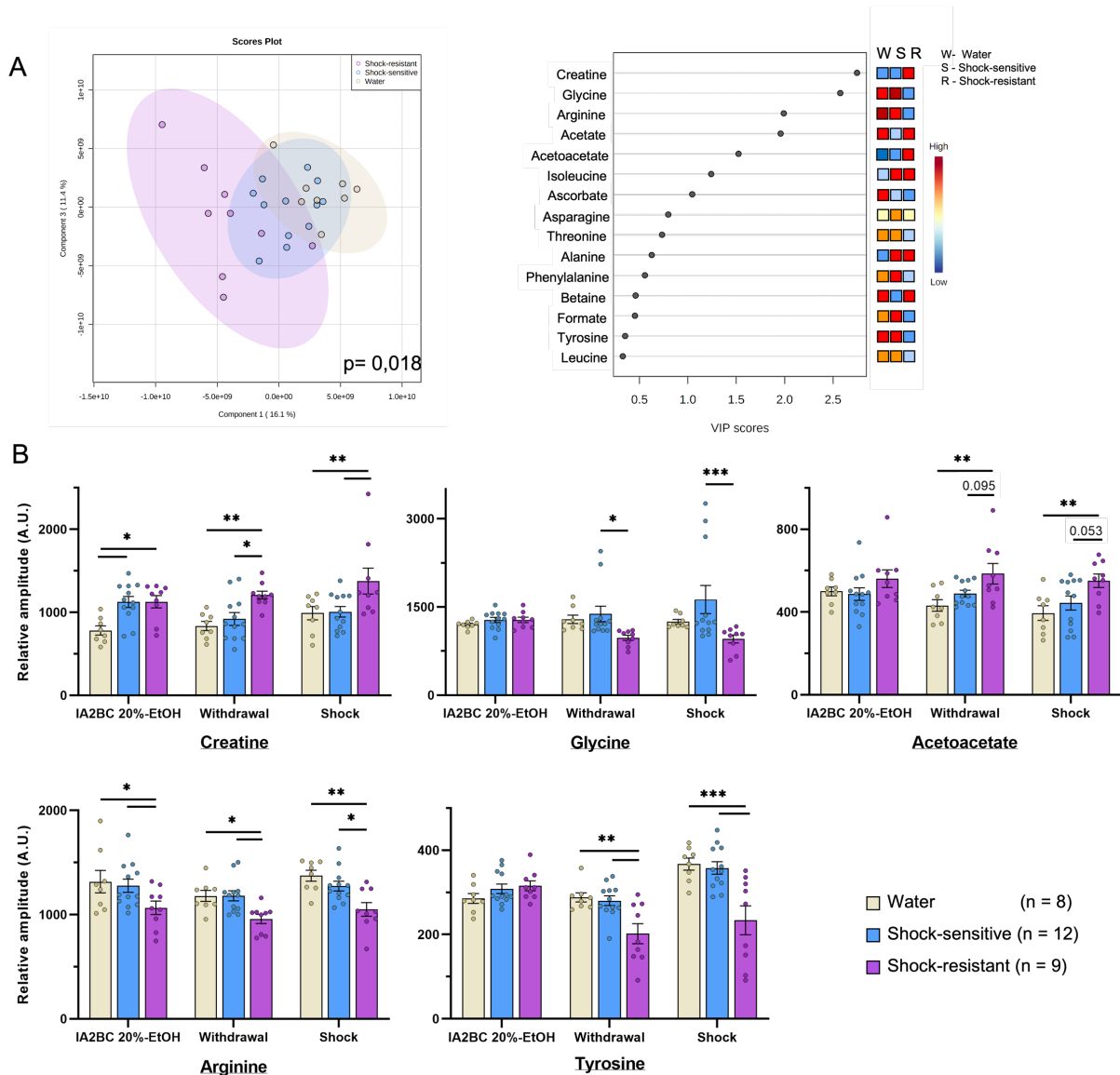
After 7 weeks of intermittent-access 20%-Ethanol two-bottle-choice drinking (*IA2BC 20%-EtOH*), 21 *Long-Evans* rats underwent 1 week of withdrawal. Rats were then trained for 8 weeks in an operant ethanol self-administration task under a fixed ratio (FR3 – 30 minutes). At the end of the training, identification of rats expressing compulsive alcohol-related behavior was achieved by coupling lever presses with intermittent footshocks (1 footshock/8 presses, 0,25 mA). At this stage, rats were divided into two groups (A and B) to ensure that any decrease in performance was the result of shock and not the effect of time. Rats of the group A were therefore shocked during the first six days (*Shock*) followed by 6 days without shock (*No Shock*). For the group B, tests were carried out in opposite orders. A control group, composed of 8 *Long-Evans* rats, was also constituted. These animals were kept under the same conditions but were never exposed to alcohol. Serum samples were collected after the end of the *IA2BC 20%-EtOH*, after a week of withdrawal and after the last session of punishment. To avoid possible residual pharmacological effect of alcohol or effect of the punishment, samples were collected 24h post-sessions.



**Figure 2: Determination of shock-sensitive and shock-resistant animals and relation to their respective alcohol-related behaviors.**

**(A)** Ethanol intake during the *IA2BC 20%-EtOH*. Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of sessions [ $F_{(20, 380)} = 7.82, P < 0.001$ ] but no differences between shock-sensitive and shock-resistant animals [ $F_{(1,19)} = 0.13, P = 0.72$ ] nor interaction between both factors [ $F_{(20, 380)} = 0.47, P = 0.98$ ]. **(B)** Number of lever presses in 30 minutes for a 20% ethanol solution during 3 days of baseline, during the 6 “no-shock” sessions and during the 6 “shock” sessions. Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of sessions [ $F_{(14, 266)} = 5.35, P < 0.001$ ], no differences between sensitive and resistant animals [ $F_{(1, 19)} = 1.63, P = 0.22$ ], but an interaction between both factors [ $F_{(14, 266)} = 2.86, P < 0.001$ ]. **(C)** Mean lever presses during the 3 last “No-Shock” sessions and the 3 last “Shock” sessions normalized to the last 3 days of baseline. Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of sessions [ $F_{(1, 19)} = 44.67, P < 0.001$ ], a significant difference between shock-sensitive and shock-resistant animals [ $F_{(1, 19)} = 22.25, P < 0.001$ ], and

an interaction between both factors [ $F_{(1, 19)} = 20.89, P < 0.001$ ]. **(D-F)** Correlation between ethanol intake in the first 30 minutes **(D)**, ethanol intake in 24 hours **(E)** or the ethanol preference in 24 hours **(F)** over the 3 last drinking session in *IA2BC EtOH 20%* and the resistance to shock (expressed as percentage of lever presses change during the 3 last “Shock” sessions compared to baseline) ( $r^2s < 0.0208, Ps > 0.53$ ). **(G-H)** Correlation between the number of lever presses **(G)** or head entries **(H)** during the baseline and the resistance to shock ( $r^2s < 0.1083, Ps > 0.15$ ). Shock-sensitive (blue,  $n = 12$ ) and shock resistant-rats (purple,  $n = 9$ ) were discriminated based on their resistance to shock. The cut-off point to be considered as shock-resistant was set at 70%. Data are expressed in mean  $\pm$  SEM. Bonferroni correction post-hoc analysis: \*\*\*,  $P < 0.001$ .

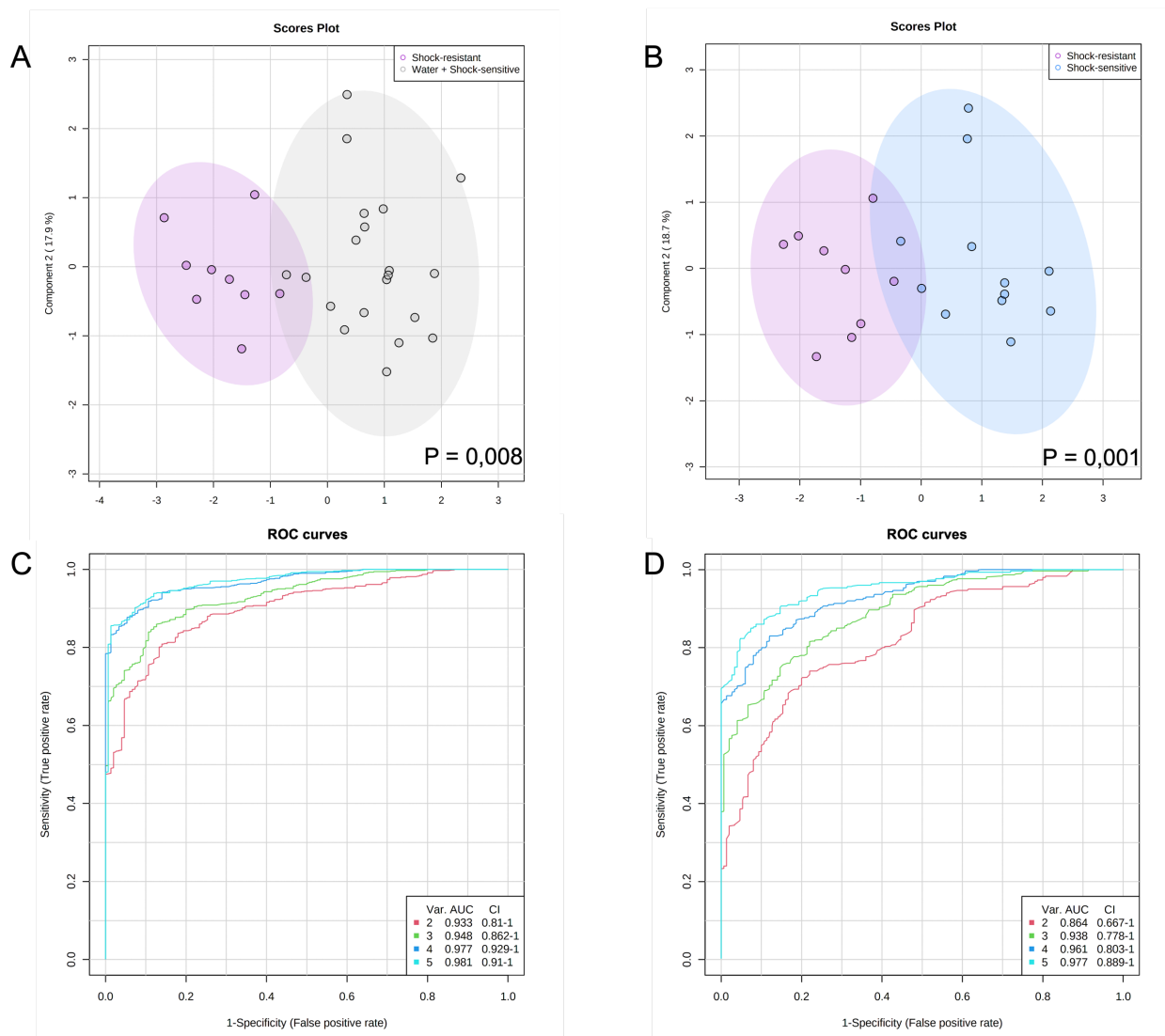


**Figure 3: Longitudinal serum  $^1\text{H}$ -RMN analysis highlighted withdrawal metabolic dysregulation associated with shock-resistant animals**

**(A)** The Scores plot (left) and its respective VIP plot (right) highlighting the TOP-15 metabolites responsible for the separation. A separation was observed between the three groups especially for shock-resistant (purple,  $n = 9$ ) compared to shock-sensitive (blue,  $n = 12$ ), and water (gray,  $n = 8$ ) rats. Following permutation testing (2000 repeats), the PLS-DA model produced a  $p$ -value = 0.018, indicating that the observed separation is significant and not due to overfitting. Additionally, following a 10-fold cross validation of the model, factors assessing the goodness of the fit,  $R^2Y = 0.87$ , and the predictability of the model,  $Q^2 = 0.46$ , were determined. **(B)** Longitudinal relative amplitude of serum metabolites illustrating the best predictive metabolites (Creatine, Glycine, Acetoacetate and Arginine) and a metabolite

presented an attractive dysregulation (Tyrosine) in order to detect shock-resistant animals compared to others during withdrawal. Creatine: Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of the group [ $F_{(2, 26)} = 14.64, P < 0.001$ ], but no effect of time nor interaction [ $F_s < 2.32, P_s > 0.11$ ]. Glycine: Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of the group [ $F_{(2, 26)} = 7.17, P < 0.01$ ], but no effect of time nor interaction [ $F_s < 2.25, P_s > 0.08$ ]. Acetoacetate: Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of the group [ $F_{(2, 26)} = 11.69, P < 0.001$ ], but no effect of time nor interaction [ $F_s < 1.86, P_s > 0.16$ ]. Arginine: Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of the group [ $F_{(2, 26)} = 12.47, P < 0.001$ ], of the time [ $F_{(2, 52)} = 4.14, P < 0.05$ ] but no interaction [ $F_{(4, 52)} = 0.23, P = 0.92$ ]. Tyrosine: Two-way RM ANOVAs showed a significant effect of the group, of the time and an interaction between both factors [ $F_s > 6.26, P_s < 0.001$ ]. Serum samples were collected 24h-after the end of the *IA2BC 20%-EtOH*, after a week of withdrawal and 24h-after the last session of punishment Serum samples were analyzed by untargeted metabolomics using  $^1\text{H-NMR}$ . Prior to multivariate analyses, all data were normalized to the sum and mean centered. Data were analyzed using principal components analysis (PCA) and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA). Data are expressed in mean  $\pm$  SEM. Tuckey multiples comparison post-hoc analysis: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ \*\*\*,  $P < 0.001$ .





**Figure 4: Discriminative power of the five selected metabolites and evaluation of biomarker performance to predict vulnerability to compulsive alcohol-related behavior.**

**(A - B)** Score plots using previously five selected metabolites (Creatine, Glycine, Acetoacetate, Tyrosine, Arginine) of withdrawal serum samples comparing shock-resistant vs shock-sensitive + water groups **(A)** or comparing shock-resistant vs shock-sensitive groups **(B)**. In both, a clear separation was observed and following permutation testing (2000 repeats), the PLS-DA model produced a p value = 0.008 **(A)** or p = 0.001 **(B)** indicating that the observed separation is significant and not due to overfitting. Additionally, following a 10-fold cross validation of the model, factors assessing the goodness of the fit ( $R^2Ys = 0.76$ ) and the predictability of the model ( $Q^2s > 0.68$ ) were determined. **(C - D)** ROC curves illustrating biomarkers diagnosis and prognosis abilities to detect shock-resistant rats among alcohol drinking and non-drinking animals **(C)** or among alcohol drinking animals only **(D)**. ROC curves were generated by Monte-

Carlo cross validation (MCCV) using balanced subsampling. In each MCCV, 2/3 of samples were used to evaluate feature importance, and the remaining 1/3 was used to validate the models created at the first step. To calculate performance and confidence intervals of each model MCCV was repeated several times. Five biomarker models were created using a linear support vector machine (SVM) with different numbers of metabolites. ROC curves were generated using the predicted class probabilities from repeated cross validation for each model. Metabolite numbers, area under the curve (AUC) and the 95% confidence interval of the four models are indicated in the panel (*bottom right*). In general, an AUC of 0.5 suggests no diagnostic ability, 0.7 to 0.8 is considered acceptable, 0.8 to 0.9 is considered excellent, and more than 0.9 is considered outstanding (Hosmer and Lemeshow, 2000; Mandrekar, 2010).

## References

Hosmer DW, Lemeshow S (2000) Applied Logistic Regression. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Mandrekar JN (2010) Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *Journal of Thoracic Oncology* 5:1315–1316.



# Références bibliographiques

- Aarsland, D., Pålhagen, S., Ballard, C. G., Ehrt, U., & Svenningsson, P. (2012). Depression in Parkinson disease - Epidemiology, mechanisms and management. In *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.189>
- Aarsland, D., Zaccari, J., & Brayne, C. (2005). A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. In *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.20527>
- Abou-Hamdan, M., Cornille, E., Khrestchatsky, M., de, M., & Gharib, B. (2011). The Energy Crisis in Parkinson's Disease: A Therapeutic Target. In *Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease*. InTech. <https://doi.org/10.5772/17369>
- Adler, C. H., Beach, T. G., Hentz, J. G., Shill, H. A., Caviness, J. N., Driver-Dunckley, E., Sabbagh, M. N., Sue, L. I., Jacobson, S. A., Belden, C. M., & Dugger, B. N. (2014). Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: Clinicopathologic study. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000641>
- Adler, C. H., Hentz, J. G., Shill, H. A., Sabbagh, M. N., Driver-Dunckley, E., Evidente, V. G. H., Jacobson, S. A., Beach, T. G., Boeve, B., & Caviness, J. N. (2011). Probable RBD is increased in Parkinson's disease but not in essential tremor or restless legs syndrome. *Parkinsonism and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.03.007>
- Ahmed, S. S., Santosh, W., Kumar, S., & Christlet, H. T. T. (2009). Metabolic profiling of Parkinson's disease: Evidence of biomarker from gene expression analysis and rapid neural network detection. *Journal of Biomedical Science*. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-63>
- Albarran, S., Rangel-Barajas, C., & Garduo, B. F. (2014). Pathophysiology of L-Dopa Induced Dyskinesia — Changes in D1/D3 Receptors and Their Signaling Pathway. In *A Synopsis of Parkinson's Disease*. <https://doi.org/10.5772/57102>
- Anandhan, A., Jacome, M. S., Lei, S., Hernandez-Franco, P., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Powers, R., & Franco, R. (2017). Metabolic Dysfunction in Parkinson's Disease: Bioenergetics, Redox Homeostasis and Central Carbon Metabolism. In *Brain Research Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.009>
- Anandhan, A., Lei, S., Levytskyy, R., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Cerny, R. L., Khalimonchuk, O., Powers, R., & Franco, R. (2017a). Glucose Metabolism and AMPK Signaling Regulate Dopaminergic Cell Death Induced by Gene ( $\alpha$ -Synuclein)-Environment (Paraquat) Interactions. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9906-2>
- Anandhan, A., Lei, S., Levytskyy, R., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Cerny, R. L., Khalimonchuk, O., Powers, R., & Franco, R. (2017b). Glucose Metabolism and AMPK Signaling Regulate Dopaminergic Cell Death Induced by Gene ( $\alpha$ -Synuclein)-Environment (Paraquat) Interactions. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9906-2>
- Antonini, A., Chaudhuri, K. R., Martinez-Martin, P., & Odin, P. (2010). Oral and infusion levodopa-based strategies for managing motor complications in patients with parkinsons disease. In *CNS Drugs*. <https://doi.org/10.2165/11310940-000000000-00000>
- Atmaca, M. (2014). Drug-Induced Impulse Control Disorders: A Review. *Current Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.2174/157488470866613111202954>
- Attems, J., & Jellinger, K. A. (2008). The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of parkinson's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00937.x>
- Badisa, R. B., Darling-Reed, S. F., & Soliman, K. F. A. (2010). The protective role of D-glucose against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+): Induced mitochondrial dysfunction in

- C6 astroglial cells. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0200-9>
- Ballanger, B., Beaudoin-Gobert, M., Neumane, S., Epinat, J., Metereau, E., Duperrier, S., Broussolle, E., Thobois, S., Bonnefoi, F., Tourvielle, C., Lavenne, F., Costes, N., Lebars, D., Zimmer, L., Sgambato-Faure, V., & Tremblay, L. (2016). Imaging dopamine and serotonin systems on MPTP monkeys: A longitudinal pet investigation of compensatory mechanisms. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2010-15.2016>
- Barker, R. A., & Björklund, A. (2020). Animal Models of Parkinson's Disease: Are They Useful or Not? *Journal of Parkinson's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JPD-202200>
- Barker, R. A., Parmar, M., Studer, L., & Takahashi, J. (2017). Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era. In *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.014>
- Barraud, Q., Lambrecq, V., Forni, C., McGuire, S., Hill, M., Bioulac, B., Balzamo, E., Bezard, E., Tison, F., & Ghorayeb, I. (2009). Sleep disorders in Parkinson's disease: The contribution of the MPTP non-human primate model. *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.07.019>
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M. D., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C., & Nicholson, J. K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>
- Bélanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. In *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
- Bellucci, A., Collo, G., Sarnico, I., Battistin, L., Missale, C., & Spano, P. (2008). Alpha-synuclein aggregation and cell death triggered by energy deprivation and dopamine overload are counteracted by D2/D3 receptor activation. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05406.x>
- Benazzouz, A., Boraud, T., Féger, J., Burbaud, P., Bioulac, B., & Gross, C. (1996). Alleviation of experimental hemiparkinsonism by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in primates: A comparison with L-Dopa treatment. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.870110606>
- Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H., Jaros, E., Hershenson, J. S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature Genetics*, 38(5), 515–517. <https://doi.org/10.1038/ng1769>
- Benito-León, J., Cubo, E., Coronell, C., Rodríguez-Fernández, R., Pego-Reigosa, R., Paz-González, J. M., Cebrián-Pérez, E., Suarez-Gil, P., Marey-López, J., Corredera-García, E., López-González, F. J., Rodríguez-Orsorio, X., Arias-Rivas, S., Lema, M. C., Peña, J., Suarez, E., MaSolar-Sánchez, D., Vidal-Sánchez, J. A., Bergareche, A., ... Trujillo, A. G. (2012). Impact of apathy on health-related quality of life in recently diagnosed Parkinson's disease: The ANIMO study. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.23872>
- Bergman, H., Wichmann, T., & DeLong, M. R. (1990). Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.2402638>
- Bertolone, L., Shin, H. K., Stefanoni, D., Baek, J. H., Gao, Y., Morrison, E. J., Nemkov, T., Thomas, T., Francis, R. O., Hod, E. A., Zimring, J. C., Yoshida, T., Karafin, M., Schwartz, J.,

- Hudson, K. E., Spitalnik, S. L., Buehler, P. W., & D'Alessandro, A. (2020). ZOOMICS: Comparative Metabolomics of Red Blood Cells From Old World Monkeys and Humans. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.593841>
- Bezard, E., Imbert, C., Deloire, X., Bioulac, B., & Gross, C. E. (1997). A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: Evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00531-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00531-3)
- Bezard, E., Imbert, C., & Gross, C. E. (1998). Experimental models of Parkinson's disease: From the static to the dynamic. In *Reviews in the Neurosciences*. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.1998.9.2.71>
- Bezard, E., & Przedborski, S. (2011). A tale on animal models of Parkinson's Disease. In *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.23696>
- Bjo"rklund, A., & Stenevi, U. (1979). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Research*, 177(3), 555–560. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90472-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90472-4)
- Blais, E. M., Rawls, K. D., Dougherty, B. v., Li, Z. I., Kolling, G. L., Ye, P., Wallqvist, A., & Papin, J. A. (2017). Reconciled rat and human metabolic networks for comparative toxicogenomics and biomarker predictions. *Nature Communications*, 8(1), 14250. <https://doi.org/10.1038/ncomms14250>
- Blasco, H., Patin, F., Descat, A., Garçon, G., Corcia, P., Gelé, P., Lenglet, T., Bede, P., Meininger, V., Devos, D., Gossens, J. F., & Pradat, P.-F. (2018). A pharmacometabolomics approach in a clinical trial of ALS: Identification of predictive markers of progression. *PLOS ONE*, 13(6), e0198116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198116>
- Blesa, J., Trigo-Damas, I., del Rey, N. L. G., & Obeso, J. A. (2018). The use of nonhuman primate models to understand processes in Parkinson's disease. In *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1715-x>
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M. F., Benabid, A. L., Sadoul, R., & Verna, J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 65, Issue 2, pp. 135–172). [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(01\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00003-X)
- Boccard, J., & Rudaz, S. (2014). Harnessing the complexity of metabolomic data with chemometrics. *Journal of Chemometrics*, 28(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/cem.2567>
- Bogdanov, V., Kim, A., Nodel, M., Pavlenko, T., Pavlova, E., Blokhin, V., Chesnokova, N., & Ugrumov, M. (2021). A Pilot Study of Changes in the Level of Catecholamines and the Activity of  $\alpha$ -2-Macroglobulin in the Tear Fluid of Patients with Parkinson's Disease and Parkinsonian Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4736. <https://doi.org/10.3390/ijms22094736>
- BOLAM, J. P., HANLEY, J. J., BOOTH, P. A. C., & BEVAN, M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy*. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x>
- Bolam, J. P., & Smith, Y. (1990). The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90811-O](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90811-O)
- Bonneh-Barkay, D., Reaney, S. H., Langston, W. J., & di Monte, D. A. (2005). Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. In *Molecular Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.11.005>

- Borovac, J. A. (2016). Side effects of a dopamine agonist therapy for Parkinson's disease: A mini-review of clinical pharmacology. In *Yale Journal of Biology and Medicine*.
- Bourdenx, M., Dovero, S., Engeln, M., Bido, S., Bastide, M. F., Dutheil, N., Vollenweider, I., Baud, L., Piron, C., Grouthier, V., Boraud, T., Porras, G., Li, Q., Baekelandt, V., Scheller, D., Michel, A., Fernagut, P. O., Georges, F., Courtine, G., ... Dehay, B. (2015). Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by  $\alpha$ -synuclein overexpression. *Acta Neuropathologica Communications*.  
<https://doi.org/10.1186/s40478-015-0222-2>
- Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. In *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
- Braak, H., & del Tredici, K. (2008). Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkinson's disease reconsidered. *Experimental Neurology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.04.001>
- Braak, H., del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)
- Braak, H., Rüb, U., Jansen Steur, E. N. H., del Tredici, K., & de Vos, R. A. I. (2005). Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. *Neurology*.  
<https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000158422.41380.82>
- Brauer, R., Bhaskaran, K., Chaturvedi, N., Dexter, D. T., Smeeth, L., & Douglas, I. (2015). Glitazone treatment and incidence of parkinson's disease among people with diabetes: A retrospective cohort study. *PLoS Medicine*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001854>
- Burté, F., Houghton, D., Lowes, H., Pyle, A., Nesbitt, S., Yarnall, A., Yu-Wai-Man, P., Burn, D. J., Santibanez-Koref, M., & Hudson, G. (2017). metabolic profiling of Parkinson's disease and mild cognitive impairment. *Movement Disorders*, 00(00), 1–6.  
<https://doi.org/10.1002/mds.26992>
- Cai, R., Zhang, Y., Simmering, J. E., Schultz, J. L., Li, Y., Fernandez-Carasa, I., Consiglio, A., Raya, A., Polgreen, P. M., Narayanan, N. S., Yuan, Y., Chen, Z., Su, W., Han, Y., Zhao, C., Gao, L., Ji, X., Welsh, M. J., & Liu, L. (2019). Enhancing glycolysis attenuates Parkinson's disease progression in models and clinical databases. *Journal of Clinical Investigation*.  
<https://doi.org/10.1172/JCI129987>
- Çakır, T., Alsan, S., Saybaşılı, H., Akın, A., & Ülgen, K. Ö. (2007). Reconstruction and flux analysis of coupling between metabolic pathways of astrocytes and neurons: application to cerebral hypoxia. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 4(1), 48.  
<https://doi.org/10.1186/1742-4682-4-48>
- Calabresi, P., & di Filippo, M. (2015). Multitarget disease-modifying therapy in Parkinson's disease? *The Lancet Neurology*, 14(10), 975–976. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00227-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00227-6)
- Calabresi, P., di Filippo, M., Ghiglieri, V., & Picconi, B. (2008). Molecular mechanism underlying levodopa-induced dyskinesia. *Movement Disorders*.  
<https://doi.org/10.1002/mds.22019>
- Camilleri, A., & Vassallo, N. (2014). The Centrality of mitochondria in the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. In *CNS Neuroscience and Therapeutics*.  
<https://doi.org/10.1111/cns.12264>
- Campos, F. L., Carvalho, M. M., Cristovão, A. C., Je, G., Baltazar, G., Salgado, A. J., Kim, Y. S., & Sousa, N. (2013). Rodent models of Parkinson's disease: Beyond the motor



- symptomatology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00175>
- Carayol, M., Licaj, I., Achaintre, D., Sacerdote, C., Vineis, P., Key, T. J., Onland Moret, N. C., Scalbert, A., Rinaldi, S., & Ferrari, P. (2015). Reliability of Serum Metabolites over a Two-Year Period: A Targeted Metabolomic Approach in Fasting and Non-Fasting Samples from EPIC. *PLOS ONE*, *10*(8), e0135437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135437>
- Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D., & Björklund, A. (2007). Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain*.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awm082>
- Castagnoli, N., Chiba, K., & Trevor, A. J. (1985). V. Potential bioactivation pathways for the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Sciences*.  
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90063-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90063-3)
- Castle, M. J., Gershenson, Z. T., Giles, A. R., Holzbaur, E. L. F., & Wolfe, J. H. (2014). Adeno-Associated Virus Serotypes 1, 8, and 9 Share Conserved Mechanisms for Anterograde and Retrograde Axonal Transport. *Human Gene Therapy*, *25*(8), 705–720.  
<https://doi.org/10.1089/hum.2013.189>
- Castrioto, A., Lhommée, E., Moro, E., & Krack, P. (2014). Mood and behavioural effects of subthalamic stimulation in Parkinson’s disease. In *The Lancet Neurology*.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70294-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70294-1)
- Caudal, D., Alvarsson, A., Björklund, A., & Svenningsson, P. (2015). Depressive-like phenotype induced by AAV-mediated overexpression of human  $\alpha$ -synuclein in midbrain dopaminergic neurons. *Experimental Neurology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.09.002>
- Chaudhuri, A. D., Kabaria, S., Choi, D. C., Mouradian, M. M., & Junn, E. (2015). MicroRNA-7 promotes glycolysis to protect against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.625962>
- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., & Schapira, A. H. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson’s disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*, *5*(3), 235–245.  
[https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(06)70373-8)
- Chaudhuri, K. R., & Schapira, A. H. (2009). Non-motor symptoms of Parkinson’s disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. In *The Lancet Neurology* (Vol. 8, Issue 5, pp. 464–474). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70068-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70068-7)
- Chesselet, M.-F., Fleming, S., Mortazavi, F., & Meurers, B. (2008). Strengths and limitations of genetic mouse models of Parkinson’s disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *14 Suppl 2*, S84–7. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.004>
- Chiba, K., Trevor, A., & Castagnoli, N. (1984). Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)91293-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)91293-2)
- Choudhury, G. R., & Daadi, M. M. (2018). Charting the onset of Parkinson-like motor and non-motor symptoms in nonhuman primate model of Parkinson’s disease. *PLOS ONE*, *13*(8), e0202770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202770>
- Chougar, L., Pyatigorskaya, N., Degos, B., Grabli, D., & Lehericy, S. (2020). The Role of Magnetic Resonance Imaging for the Diagnosis of Atypical Parkinsonism. *Frontiers in Neurology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00665>
- Chung, S. J., Yoo, H. S., Lee, H. S., Jeong, H. E., Kim, S. J., Oh, J. S., Kim, J. S., Sohn, Y. H., & Lee, P. H. (2018). Does Late Levodopa Administration Delay the Development of Dyskinesia

- in Patients with De Novo Parkinson's Disease? *CNS Drugs*.  
<https://doi.org/10.1007/s40263-018-0549-x>
- Ciobanu, A., Ionita, I., Buleandra, M., David, I., Popa, D., Ciucu, A., & Budisteanu, M. (2021). Current advances in metabolomic studies on non-motor psychiatric manifestations of Parkinson's disease (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(3), 1010. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10443>
- Colca, J. R. (2015). The TZD insulin sensitizer clue provides a new route into diabetes drug discovery. In *Expert Opinion on Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1100164>
- Cookson, M. R. (2012). Parkinsonism due to mutations in PINK1, Parkin, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009415>
- Creed, R. B., & Goldberg, M. S. (2018). New Developments in Genetic rat models of Parkinson's Disease. In *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.27296>
- C.W., O., M.B., S., & K., S. (2009). The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology*.
- Davis, G. C., Williams, A. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Caine, E. D., Reichert, C. M., & Kopin, I. J. (1979). Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Research*. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(79\)90006-4](https://doi.org/10.1016/0165-1781(79)90006-4)
- Dawson, T. M., Ko, H. S., & Dawson, V. L. (2010). Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Neuron*, 66(5), 646–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.034>
- de Marzi, R., Seppi, K., Högl, B., Müller, C., Scherfler, C., Stefani, A., Iranzo, A., Tolosa, E., Santamaria, J., Gizewski, E., Schocke, M., Skalla, E., Kremser, C., & Poewe, W. (2016). Loss of dorsolateral nigral hyperintensity on 3.0 tesla susceptibility-weighted imaging in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.24646>
- Decressac, M., Mattsson, B., Lundblad, M., Weikop, P., & Björklund, A. (2012). Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of  $\alpha$ -synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.013>
- Dehay, B., & Fernagut, P. O. (2016). Alpha-synuclein-based models of Parkinson's disease. In *Revue Neurologique*. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2016.04.003>
- Detka, J., Kurek, A., Kucharczyk, M., Głombik, K., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Lasoń, W., & Budziszewska, B. (2015). Brain glucose metabolism in an animal model of depression. *Neuroscience*, 295, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.046>
- di Filippo, M., Chiasserini, D., Tozzi, A., Picconi, B., & Calabresi, P. (2010). Mitochondria and the link between neuroinflammation and neurodegeneration. In *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100543>
- Diaconu, Ștefania, Falup-pecurariu, O., Țiņț, D., & Falup-Pecurariu, C. (2021). REM sleep behaviour disorder in Parkinson's disease (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(2), 812. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10244>
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013a). The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), 461–491. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013b). The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), 461–491. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>

- Dickson, D. W., Fujishiro, H., Orr, C., DelleDonne, A., Josephs, K. A., Frigerio, R., Burnett, M., Parisi, J. E., Klos, K. J., & Ahlskog, J. E. (2009). Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70769-2](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70769-2)
- Dickson, D. W., Uchikado, H., Fujishiro, H., & Tsuboi, Y. (2010). Evidence in favor of Braak staging of Parkinson's disease. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.22637>
- Diederich, N. J., Fénelon, G., Stebbins, G., & Goetz, C. G. (2009). Hallucinations in Parkinson disease. In *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2009.62>
- Dienel, G. A. (2019). Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017>
- Dijkstra, A. A., Voorn, P., Berendse, H. W., Groenewegen, H. J., Rozemuller, A. J. M., & van de Berg, W. D. J. (2014). Stage-dependent nigral neuronal loss in incidental Lewy body and parkinson's disease. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.25952>
- Divakaruni, A. S., Wallace, M., Buren, C., Martyniuk, K., Andreyev, A. Y., Li, E., Fields, J. A., Cordes, T., Reynolds, I. J., Bloodgood, B. L., Raymond, L. A., Metallo, C. M., & Murphy, A. N. (2017). Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612067>
- Divakaruni, A. S., Wiley, S. E., Rogers, G. W., Andreyev, A. Y., Petrosyan, S., Loviscach, M., Wall, E. A., Yadava, N., Heuck, A. P., Ferrick, D. A., Henry, R. R., McDonald, W. G., Colca, J. R., Simon, M. I., Ciaraldi, T. P., & Murphy, A. N. (2013). Thiazolidinediones are acute, specific inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(14), 5422–5427. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303360110>
- Doi, D., Magotani, H., Kikuchi, T., Ikeda, M., Hiramatsu, S., Yoshida, K., Amano, N., Nomura, M., Umekage, M., Morizane, A., & Takahashi, J. (2020). Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17165-w>
- Donatti, A., Canto, A. M., Godoi, A. B., da Rosa, D. C., & Lopes-Cendes, I. (2020). Circulating metabolites as potential biomarkers for neurological disorders—metabolites in neurological disorders. *Metabolites*. <https://doi.org/10.3390/metabo10100389>
- Drijgers, R. L., Dujardin, K., Reijnders, J. S. A. M., Defebvre, L., & Leentjens, A. F. G. (2010). Validation of diagnostic criteria for apathy in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.08.015>
- Drucker, E., & Krapfenbauer, K. (2013). Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine. *EPMA Journal*, *4*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1878-5085-4-7>
- Drui, G., Carnicella, S., Carcenac, C., Favier, M., Bertrand, a, Boulet, S., & Savasta, M. (2014). Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Molecular Psychiatry*, *19*(3), 358–367. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.3>
- Duan, W., & Mattson, M. P. (1999). Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990715\)57:2<195::AID-JNR5>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990715)57:2<195::AID-JNR5>3.0.CO;2-P)
- Dumas, M.-E., Maibaum, E. C., Teague, C., Ueshima, H., Zhou, B., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Stamler, J., Elliott, P., Chan, Q., & Holmes, E. (2006). Assessment of Analytical Reproducibility of 1 H NMR Spectroscopy Based Metabonomics for Large-Scale

- Epidemiological Research: the INTERMAP Study. *Analytical Chemistry*, 78(7), 2199–2208. <https://doi.org/10.1021/ac0517085>
- Ehrt, U., Brønnick, K., Leentjens, A. F. G., Larsen, J. P., & Aarsland, D. (2006). Depressive symptom profile in Parkinson's disease: A comparison with depression in elderly patients without Parkinson's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. <https://doi.org/10.1002/gps.1456>
- Emborg, M. E. (2007). Nonhuman primate models of Parkinson's disease. In *ILAR Journal*. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.4.339>
- Emwas, A.-H. M. (2015a). *The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research* (pp. 161–193). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13)
- Emwas, A.-H. M. (2015b). *The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research* (pp. 161–193). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13)
- Emwas, A.-H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Gowda, G. A. N., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., & Wishart, D. S. (2019). NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*, 9(7), 123. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
- Eriksson, L., Trygg, J., & Wold, S. (2008). CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models. *Journal of Chemometrics*, 22(11–12), 594–600. <https://doi.org/10.1002/cem.1187>
- Eskow Jaunarajs, K. L., George, J. A., & Bishop, C. (2012). L-DOPA-induced dysregulation of extrastriatal dopamine and serotonin and affective symptoms in a bilateral rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.052>
- Everett, J. R. (2015). Pharmacometabonomics in humans: A new tool for personalized medicine. In *Pharmacogenomics*. <https://doi.org/10.2217/pgs.15.20>
- Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C., & Winklhofer, K. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO Journal*, 31(14), 3038–3062. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.170>
- Fauvelle, F., Carpentier, P., Dorandeu, F., Foquin, A., & Testylier, G. (2012). Prediction of Neuroprotective Treatment Efficiency Using a HRMAS NMR-Based Statistical Model of Refractory Status Epilepticus on Mouse: A Metabolomic Approach Supported by Histology. *Journal of Proteome Research*, 11(7), 3782–3795. <https://doi.org/10.1021/pr300291d>
- Favier, M., Carcenac, C., Drui, G., Vachez, Y., Boulet, S., Savasta, M., & Carnicella, S. (2017). Implication of dorsostriatal D3 receptors in motivational processes: A potential target for neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep41589>
- Favier, M., Duran, T., Carcenac, C., Drui, G., Savasta, M., & Carnicella, S. (2014). Pramipexole reverses Parkinson's disease-related motivational deficits in rats. *Movement Disorders*, 29(7), 912–920. <https://doi.org/10.1002/mds.25837>
- Fecher, C., Trovò, L., Müller, S. A., Snaidero, N., Wettmarshausen, J., Heink, S., Ortiz, O., Wagner, I., Kühn, R., Hartmann, J., Karl, R. M., Konnerth, A., Korn, T., Wurst, W., Merkler, D., Lichtenthaler, S. F., Perocchi, F., & Misgeld, T. (2019). Cell-type-specific profiling of brain mitochondria reveals functional and molecular diversity. *Nature Neuroscience*, 22(10), 1731–1742. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0479-z>

- Fedotova, E. I., Dolgacheva, L. P., Abramov, A. Y., & Berezhnov, A. v. (2021). Lactate and Pyruvate Activate Autophagy and Mitophagy that Protect Cells in Toxic Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02583-8>
- Fernagut, P. O., & Chesselet, M. F. (2004). Alpha-synuclein and transgenic mouse models. In *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.07.001>
- Floegel, A., von Ruesten, A., Drogan, D., Schulze, M. B., Prehn, C., Adamski, J., Pischon, T., & Boeing, H. (2013). Variation of serum metabolites related to habitual diet: a targeted metabolomic approach in EPIC-Potsdam. *European Journal of Clinical Nutrition*, *67*(10), 1100–1108. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.147>
- Fornai, F., Schlüter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C. L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A., & Südhof, T. C. (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: Convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and  $\alpha$ -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409713102>
- Forno, L. S., Langston, J. W., DeLanney, L. E., Irwin, I., & Ricaurte, G. A. (1986). Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.410200403>
- Fox, S. H. (2013). Non-dopaminergic treatments for motor control in Parkinson's disease. In *Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0105-4>
- Fox, S. H., & Brotchie, J. M. (2010). The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. In *Progress in Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)84007-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)84007-5)
- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W.-Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q., Eidelberg, D., & Fahn, S. (2001). Transplantation of Embryonic Dopamine Neurons for Severe Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejm200103083441002>
- French, I. T., & Muthusamy, K. A. (2018). A review of the pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease. In *Frontiers in Aging Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00099>
- Fujisawa, K., Nishikawa, T., Kukidome, D., Imoto, K., Yamashiro, T., Motoshima, H., Matsumura, T., & Araki, E. (2009). TZDs reduce mitochondrial ROS production and enhance mitochondrial biogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *379*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.141>
- Gallagher, M. W., Bentley, K. H., & Barlow, D. H. (2014). Perceived Control and Vulnerability to Anxiety Disorders: A Meta-analytic Review. *Cognitive Therapy and Research*. <https://doi.org/10.1007/s10608-014-9624-x>
- Gao, L., Tang, H., Nie, K., Wang, L., Zhao, J., Gan, R., Huang, J., Zhu, R., Feng, S., Duan, Z., Zhang, Y., & Wang, L. (2015). Cerebrospinal fluid alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Neuroscience*, *125*(9), 645–654. <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.961454>
- Ghosh, A., Tyson, T., George, S., Hildebrandt, E. N., Steiner, J. A., Madaj, Z., Schulz, E., MacHiela, E., McDonald, W. G., Galvis, M. L. E., Kordower, J. H., van Raamsdonk, J. M., Colca, J. R., & Brundin, P. (2016). Mitochondrial pyruvate carrier regulates autophagy,

- inflammation, and neurodegeneration in experimental models of Parkinson's disease. *Science Translational Medicine*, 8(368). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag2210>
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Quinn, S. M., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2002). Neuronal  $\alpha$ -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00682-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00682-7)
- Giovanni, A., Sieber, B. A., Heikkila, R. E., & Sonsalla, P. K. (1994). Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.
- Glaab, E., Trezzi, J. P., Greuel, A., Jäger, C., Hodak, Z., Drzezga, A., Timmermann, L., Tittgemeyer, M., Diederich, N. J., & Eggers, C. (2019). Integrative analysis of blood metabolomics and PET brain neuroimaging data for Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.01.003>
- Goetz, C. G. (2011). The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>
- Goldenberg, M. M. (2008). Medical management of Parkinson's disease. In *P and T*.
- Graham, S. F., Rey, N. L., Yilmaz, A., Kumar, P., Madaj, Z., Maddens, M., Bahado-Singh, R. O., Becker, K., Schulz, E., Meyerdirk, L. K., Steiner, J. A., Ma, J., & Brundin, P. (2018). Biochemical Profiling of the Brain and Blood Metabolome in a Mouse Model of Prodromal Parkinson's Disease Reveals Distinct Metabolic Profiles. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00224>
- Gray, L. R., Tompkins, S. C., & Taylor, E. B. (2014). Regulation of pyruvate metabolism and human disease. In *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1539-2>
- Guillet-Pichon, V., & Verny, C. (2016). Mitochondrie et maladies neurodégénératives. *Pratique Neurologique - FMC*, 7(2), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.praneu.2016.01.024>
- Halim, N. D., Mcfate, T., Mohyeldin, A., Okagaki, P., Korotchikina, L. G., Patel, M. S., Jeoung, N. H., Harris, R. A., Schell, M. J., & Verma, A. (2010). Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia*, 58(10), 1168–1176. <https://doi.org/10.1002/glia.20996>
- Hasenour, C. M., Rahim, M., & Young, J. D. (2020). In Vivo Estimates of Liver Metabolic Flux Assessed by  $^{13}\text{C}$ -Propionate and  $^{13}\text{C}$ -Lactate Are Impacted by Tracer Recycling and Equilibrium Assumptions. *Cell Reports*, 32(5), 107986. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107986>
- Hatano, T., Saiki, S., Okuzumi, A., Mohny, R. P., & Hattori, N. (2015). Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 1–7. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-309676>
- Hawkes, C. H., del Tredici, K., & Braak, H. (2007). Parkinson's disease: A dual-hit hypothesis. In *Neuropathology and Applied Neurobiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00874.x>
- Hernandes, V. V., Barbas, C., & Dudzik, D. (2017). A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. *ELECTROPHORESIS*, 38(18), 2232–2241. <https://doi.org/10.1002/elps.201700086>
- Herrera, A., Muñoz, P., Steinbusch, H. W. M., & Segura-Aguilar, J. (2017). Are Dopamine Oxidation Metabolites Involved in the Loss of Dopaminergic Neurons in the Nigrostriatal

- System in Parkinson's Disease? *ACS Chemical Neuroscience*, 8(4), 702–711.  
<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00034>
- Herting, B., Bietenbeck, S., Scholz, K., Hähner, A., Hummel, T., & Reichmann, H. (2008). Olfactory dysfunction in Parkinson's disease: Its role as a new cardinal sign in early and differential diagnosis. *Nervenarzt*. <https://doi.org/10.1007/s00115-007-2326-9>
- Hoehn, M. M., & Yahr, M. D. (1967). Parkinsonism: Onset, progression, and mortality. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/wnl.17.5.427>
- Holloway, R., Shoulson, I., Kieburtz, K., McDermott, M., Tariot, P., Kamp, C., Day, D., Shinaman, A., Fahn, S., Lang, A., Marek, K., Seibyl, J., Weiner, W., & Welsh, M. (2000). Pramipexole vs Levodopa as initial treatment for Parkinson disease: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*.  
<https://doi.org/10.1001/jama.284.15.1931>
- Hughes, A. J., Daniel, S. E., Kilford, L., & Lees, A. J. (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: A clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp.55.3.181>
- Hui, S., Cowan, A. J., Zeng, X., Yang, L., TeSlaa, T., Li, X., Bartman, C., Zhang, Z., Jang, C., Wang, L., Lu, W., Rojas, J., Baur, J., & Rabinowitz, J. D. (2020). Quantitative Fluxomics of Circulating Metabolites. *Cell Metabolism*, 32(4), 676-688.e4.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.013>
- Iglesias, J., Morales, L., & Barreto, G. E. (2017). Metabolic and Inflammatory Adaptation of Reactive Astrocytes: Role of PPARs. In *Molecular Neurobiology*.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-9833-2>
- Ip, C. W., Klaus, L. C., Karikari, A. A., Visanji, N. P., Brotchie, J. M., Lang, A. E., Volkman, J., & Koprach, J. B. (2017). AAV1/2-induced overexpression of A53T- $\alpha$ -synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0416-x>
- Iravani, M. M., McCreary, A. C., & Jenner, P. (2012). Striatal plasticity in Parkinson's disease and L-DOPA induced dyskinesia. *Parkinsonism and Related Disorders*.  
[https://doi.org/10.1016/s1353-8020\(11\)70038-4](https://doi.org/10.1016/s1353-8020(11)70038-4)
- Jagmag, S. A., Tripathi, N., Shukla, S. D., Maiti, S., & Khurana, S. (2016). Evaluation of models of Parkinson's disease. In *Frontiers in Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00503>
- Jang, S. E., Qiu, L., Chan, L. L., Tan, E.-K., & Zeng, L. (2020). Current Status of Stem Cell-Derived Therapies for Parkinson's Disease: From Cell Assessment and Imaging Modalities to Clinical Trials. *Frontiers in Neuroscience*, 14.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.558532>
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. In *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
- Jankovic, J. et al. (2018). Immunologic treatment of Parkinson's disease. In *Immunotherapy*.  
<https://doi.org/10.2217/imt-2017-0146>
- Jarraya, B., Boulet, S., Ralph, G. S., Jan, C., Bonvento, G., Azzouz, M., Miskin, J. E., Shin, M., Delzescaux, T., Drouot, X., Hérard, A. S., Day, D. M., Brouillet, E., Kingsman, S. M., Hantraye, P., Mitrophanous, K. A., Mazarakis, N. D., & Palfi, S. (2009). Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000130>

- Jensen, N. J., Wodschow, H. Z., Nilsson, M., & Rungby, J. (2020). Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8767. <https://doi.org/10.3390/ijms21228767>
- Jensen, P., Krabbe, C., & Meyer, M. (2011). Cell Therapy for Parkinson's Disease: Status and Perspectives. In *Towards New Therapies for Parkinson's Disease*. <https://doi.org/10.5772/21203>
- Jha, M. K., Lee, I.-K., & Suk, K. (2016). Metabolic reprogramming by the pyruvate dehydrogenase kinase–lactic acid axis: Linking metabolism and diverse neuropathophysiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 68, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.006>
- Johnson, C. H., & Gonzalez, F. J. (2012). Challenges and opportunities of metabolomics. In *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.24002>
- Kalaitzakis, M. E., Graeber, M. B., Gentleman, S. M., & Pearce, R. K. B. (2008). The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: A critical analysis of  $\alpha$ -synuclein staging. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00923.x>
- Kalia, L. V., and Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet*, 386, 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kaluarachchi, M., Boulangé, C. L., Karaman, I., Lindon, J. C., Ebbels, T. M. D., Elliott, P., Tracy, R. P., & Olson, N. C. (2018). A comparison of human serum and plasma metabolites using untargeted  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and UPLC-MS. *Metabolomics*, 14(3), 32. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1332-1>
- Kaplitt, M. G., Feigin, A., Tang, C., Fitzsimons, H. L., Mattis, P., Lawlor, P. A., Bland, R. J., Young, D., Strybing, K., Eidelberg, D., & Durr, M. J. (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60982-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60982-9)
- Kiebertz, K., Tilley, B. C., Elm, J. J., Babcock, D., Hauser, R., Ross, G. W., Augustine, A. H., Augustine, E. U., Aminoff, M. J., Bodis-Wollner, I. G., Boyd, J., Cambi, F., Chou, K., Christine, C. W., Cines, M., Dahodwala, N., Derwent, L., Dewey, R. B., Hawthorne, K., ... Wills, A. M. (2015). Effect of creatine monohydrate on clinical progression in patients with parkinson disease: A randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.120>
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Onoe, H., Hayashi, T., Kawasaki, T., Saiki, H., Miyamoto, S., & Takahashi, J. (2011). Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JPD-2011-11070>
- Kilzheimer, A., Hentrich, T., Burkhardt, S., & Schulze-Hentrich, J. M. (2019). The Challenge and Opportunity to Diagnose Parkinson's Disease in Midlife. In *Frontiers in Neurology*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01328>
- Kim, A., Nigmatullina, R., Zalyalova, Z., Soshnikova, N., Krasnov, A., Vorobyeva, N., Georgieva, S., Kudrin, V., Narkevich, V., & Ugrumov, M. (2019). Upgraded Methodology for the Development of Early Diagnosis of Parkinson's Disease Based on Searching Blood Markers in Patients and Experimental Models. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1315-2>
- Kim, S., Kwon, S. H., Kam, T. I., Panicker, N., Karuppagounder, S. S., Lee, S., Lee, J. H., Kim, W. R., Kook, M., Foss, C. A., Shen, C., Lee, H., Kulkarni, S., Pasricha, P. J., Lee, G., Pomper, R.,



- M. G., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ko, H. S. (2019). Transneuronal Propagation of Pathologic  $\alpha$ -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.035>
- Kim, T. Y., Leem, E., Lee, J. M., & Kim, S. R. (2020). Control of Reactive Oxygen Species for the Prevention of Parkinson's Disease: The Possible Application of Flavonoids. *Antioxidants*, 9(7), 583. <https://doi.org/10.3390/antiox9070583>
- Kingsbury, A. E., Bandopadhyay, R., Silveira-Moriyama, L., Ayling, H., Kallis, C., Sterlacci, W., Maeir, H., Poewe, W., & Lees, A. J. (2010). Brain stem pathology in Parkinson's disease: An evaluation of the Braak staging model. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.23305>
- Kirik, D., Rosenblad, C., & Bjorklund, A. (2000). Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00274.x>
- Kirsch-Darrow, L., Fernandez, H. F., Marsiske, M., Okun, M. S., & Bowers, D. (2006). Dissociating apathy and depression in Parkinson disease. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000230572.07791.22>
- Kitada, T., Pisani, A., Porter, D. R., Yamaguchi, H., Tscherter, A., Martella, G., Bonsi, P., Zhang, C., Pothos, E. N., & Shen, J. (2007). Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702717104>
- Koga, S., Aoki, N., Uitti, R. J., van Gerpen, J. A., Cheshire, W. P., Josephs, K. A., Wszolek, Z. K., Langston, J. W., & Dickson, D. W. (2015a). When DLB, PD, and PSP masquerade as MSA: an autopsy study of 134 patients. *Neurology*.
- Koga, S., Aoki, N., Uitti, R. J., van Gerpen, J. A., Cheshire, W. P., Josephs, K. A., Wszolek, Z. K., Langston, J. W., & Dickson, D. W. (2015b). When DLB, PD, and PSP masquerade as MSA. *Neurology*, 85(5), 404–412. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001807>
- Kohl, S. M., Klein, M. S., Hochrein, J., Oefner, P. J., Spang, R., & Gronwald, W. (2012). State-of-the-art data normalization methods improve NMR-based metabolomic analysis. *Metabolomics*, 8(S1), 146–160. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0350-z>
- Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., & Olanow, C. W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1747>
- Kosaka, K., Tsuchiya, K., & Yoshimura, M. (1988). Lewy body disease with and without dementia: A clinicopathological study of 35 cases. *Clinical Neuropathology*.
- Krack, P., Batir, A., van Blercom, N., Chabardes, S., Fraix, V., Ardouin, C., Koudsie, A., Limousin, P. D., Benazzouz, A., LeBas, J. F., Benabid, A. L., & Pollak, P. (2003). Five-Year Follow-up of Bilateral Stimulation of the Subthalamic Nucleus in Advanced Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035275>
- Kumari, S., Goyal, V., Kumaran, S. S., Dwivedi, S. N., Srivastava, A., & Jagannathan, N. R. (2020). Quantitative metabolomics of saliva using proton NMR spectroscopy in patients with Parkinson's disease and healthy controls. *Neurological Sciences*, 41(5), 1201–1210. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-04143-4>
- Kuter, K., Olech, Ł., Głowacka, U., & Paleczna, M. (2018). Astrocyte support is important for the compensatory potential of the nigrostriatal system neurons during early neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, jnc.14605. <https://doi.org/10.1111/jnc.14605>

- Lang, A. E., Gill, S., Patel, N. K., Lozano, A., Nutt, J. G., Penn, R., Brooks, D. J., Hotton, G., Moro, E., Heywood, P., Brodsky, M. A., Burchiel, K., Kelly, P., Dalvi, A., Scott, B., Stacy, M., Turner, D., Wooten, V. G. F., Elias, W. J., ... Traub, M. (2006). Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.20737>
- Langston, J. W., Forno, L. S., Tetrad, J., Reeves, A. G., Kaplan, J. A., & Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of Neurology*. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199910\)46:4<598::AID-ANA7>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199910)46:4<598::AID-ANA7>3.0.CO;2-F)
- Lee, D. J., Milosevic, L., Gramer, R., Sasikumar, S., Al-Ozzi, T. M., de Vloo, P., Dallapiazza, R. F., Elias, G. J. B., Cohn, M., Kalia, S. K., Hutchison, W. D., Fasano, A., & Lozano, A. M. (2020). Nucleus basalis of Meynert neuronal activity in Parkinson's disease. *Journal of Neurosurgery*. <https://doi.org/10.3171/2018.11.JNS182386>
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P. W., Pellerin, L., Magistretti, P. J., & Rothstein, J. D. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11314>
- Leenaars, C. H. C., Kouwenaar, C., Stafleu, F. R., Bleich, A., Ritskes-Hoitinga, M., de Vries, R. B. M., & Meijboom, F. L. B. (2019). Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 223. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1976-2>
- Leentjens, A. F. G. (2004). Depression in Parkinson's disease: Conceptual issues and clinical challenges. In *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*. <https://doi.org/10.1177/0891988704267456>
- Lei, S., & Powers, R. (2013). NMR Metabolomics Analysis of Parkinson's Disease. *Current Metabolomics*, 1(3), 191–209. <https://doi.org/10.2174/2213235X113019990004>
- Leiknes, I., Tysnes, O. B., Aarsland, D., & Larsen, J. P. (2010). Caregiver distress associated with neuropsychiatric problems in patients with early Parkinson's disease: The Norwegian ParkWest study. *Acta Neurologica Scandinavica*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2010.01332.x>
- Letertre, M. P. M., Dervilly, G., & Giraudeau, P. (2021). Combined Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry Approaches for Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 93(1), 500–518. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04371>
- Letertre, M. P. M., Giraudeau, P., & de Tullio, P. (2021). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Clinical Metabolomics and Personalized Medicine: Current Challenges and Perspectives. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.698337>
- Levin, J., Kurz, A., Arzberger, T., Giese, A., & Höglinger, G. U. (2016). The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Deutsches Ärzteblatt International*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0061>
- Levy, M. L., Cummings, J. L., Fairbanks, L. A., Masterman, D., Miller, B. L., Craig, A. H., Paulsen, J. S., & Litvan, I. (1998). Apathy is not depression. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. <https://doi.org/10.1176/jnp.10.3.314>
- Lewitt, P. A., Li, J., Lu, M., Guo, L., & Auinger, P. (2017). Metabolomic biomarkers as strong correlates of Parkinson disease progression. *Neurology*, 88(9), 862–869. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003663>

- LeWitt, P. A., Rezai, A. R., Leehey, M. A., Ojemann, S. G., Flaherty, A. W., Eskandar, E. N., Kostyk, S. K., Thomas, K., Sarkar, A., Siddiqui, M. S., Tatter, S. B., Schwalb, J. M., Poston, K. L., Henderson, J. M., Kurlan, R. M., Richard, I. H., van Meter, L., Sapan, C. v, During, M. J., ... Feigin, A. (2011). AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *The Lancet Neurology*, *10*(4). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70039-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70039-4)
- Lhommée, E., Klinger, H., Thobois, S., Schmitt, E., Ardouin, C., Bichon, A., Kistner, A., Fraix, V., Xie, J., Aya Kombo, M., Chabards, S., Seigneuret, E., Benabid, A. L., Mertens, P., Polo, G., Carnicella, S., Quesada, J. L., Bosson, J. L., Broussolle, E., ... Krack, P. (2012). Subthalamic stimulation in Parkinson's disease: Restoring the balance of motivated behaviours. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/aws078>
- Li, J. Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., 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. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1746>
- Limousin, P., Krack, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Ardouin, C., Hoffmann, D., & Benabid, A. L. (1998). Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinsonian's disease. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM199810153391603>
- Limousin, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Hoffmann, D., le Bas, J. F., Perret, J. E., Benabid, A. L., & Broussolle, E. (1995). Effect on parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90062-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90062-4)
- Liu, X., Hoene, M., Wang, X., Yin, P., Häring, H.-U., Xu, G., & Lehmann, R. (2018). Serum or plasma, what is the difference? Investigations to facilitate the sample material selection decision making process for metabolomics studies and beyond. *Analytica Chimica Acta*, *1037*, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.03.009>
- Lu, J., Sun, F., Ma, H., Qing, H., & Deng, Y. (2015). Comparison between  $\alpha$ -synuclein wild-type and A53T mutation in a progressive Parkinson's disease model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.007>
- Lu, Y., Zhang, X., Zhao, L., Yang, C., Pan, L., Li, C., Liu, K., Bai, G., Gao, H., & Yan, Z. (2018). Metabolic disturbances in the striatum and substantia nigra in the onset and progression of MPTP-induced Parkinsonism model. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00090>
- Lu, Z., Wang, J., Li, M., Liu, Q., Wei, D., Yang, M., & Kong, L. (2014). <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics study on a goldfish model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.006>
- Luan, H., Liu, L. F., Tang, Z., Zhang, M., Chua, K. K., Song, J. X., Mok, V. C. T., Li, M., & Cai, Z. (2015). Comprehensive urinary metabolomic profiling and identification of potential noninvasive marker for idiopathic Parkinson s disease. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep13888>
- Magistretti, P. J. (2009). Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *American Journal of Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462CC>
- Mallet, D., Dufourd, T., Decourt, M., Carcenac, C., Bossù, P., Verlin, L., Fernagut, P.-O., Benoit-Marand, M., Spalletta, G., Barbier, E. L., Carnicella, S., Sgambato, V., Fauvelle, F., & Boulet, S. (2021). A metabolic biomarker for early stage of Parkinson's disease in

- patients and animal models. *Journal of Clinical Investigation*.  
<https://doi.org/10.1172/JCI146400>
- Manfredsson, F. P., Polinski, N. K., Subramanian, T., Boulis, N., Wakeman, D. R., & Mandel, R. J. (2020). The Future of GDNF in Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.593572>
- Marin, R. S., Biedrzycki, R. C., & Firinciogullari, S. (1991). Reliability and validity of the apathy evaluation scale. *Psychiatry Research*, 38(2), 143–162. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(91\)90040-V](https://doi.org/10.1016/0165-1781(91)90040-V)
- Marin-Valencia, I., Good, L. B., Ma, Q., Malloy, C. R., Patel, M. S., & Pascual, J. M. (2012). Cortical metabolism in pyruvate dehydrogenase deficiency revealed by ex vivo multiplet <sup>13</sup>C NMR of the adult mouse brain. *Neurochemistry International*, 61(7), 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.07.020>
- Markey, S. P., Johannessen, J. N., Chiueh, C. C., Burns, R. S., & Herkenham, M. A. (1984). Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/311464a0>
- Marks, W. J., Bartus, R. T., Siffert, J., Davis, C. S., Lozano, A., Boulis, N., Vitek, J., Stacy, M., Turner, D., Verhagen, L., Bakay, R., Watts, R., Guthrie, B., Jankovic, J., Simpson, R., Tagliati, M., Alterman, R., Stern, M., Baltuch, G., ... Olanow, C. W. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: A double-blind, randomised, controlled trial. *The Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70254-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70254-4)
- Marsili, L., Rizzo, G., & Colosimo, C. (2018). Diagnostic criteria for Parkinson's disease: From James Parkinson to the concept of prodromal disease. In *Frontiers in Neurology*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00156>
- Martignoni, M., Groothuis, G. M. M., & de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(6), 875–894. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>
- Martin, W. R. W., Wieler, M., & Gee, M. (2008). Midbrain iron content in early Parkinson disease: A potential biomarker of disease status. *Neurology*, 70(Issue 16, Part 2), 1411–1417. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000286384.31050.b5>
- Masini, D., Plewnia, C., Bertho, M., Scalbert, N., Caggiano, V., & Fisone, G. (2021). A Guide to the Generation of a 6-Hydroxydopamine Mouse Model of Parkinson's Disease for the Study of Non-Motor Symptoms. *Biomedicines*, 9(6), 598. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060598>
- 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  $\alpha$ -synuclein mice: Implications for neurodegenerative disorders. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.287.5456.1265>
- Meissner, W. G. (2018). Stratégies thérapeutiques ciblant l'alpha-synucléine pour le traitement de la maladie de Parkinson et des autres synucléinopathies. In *Pratique Neurologique - FMC*. <https://doi.org/10.1016/j.praneu.2018.02.005>
- Meissner, W., Prunier, C., Guilloteau, D., Chalon, S., Gross, C. E., & Bezard, E. (2003). Time-Course of Nigrostriatal Degeneration in a Progressive MPTP-Lesioned Macaque Model of Parkinson's Disease. In *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1385/MN:28:3:209>
- Menni, C., Zhai, G., MacGregor, A., Prehn, C., Römisch-Margl, W., Suhre, K., Adamski, J., Cassidy, A., Illig, T., Spector, T. D., & Valdes, A. M. (2013). Targeted metabolomics

- profiles are strongly correlated with nutritional patterns in women. *Metabolomics*, 9(2), 506–514. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0469-6>
- Menza, M. A., Robertson-Hoffman, D. E., & Bonapace, A. S. (1993). Parkinson's disease and anxiety: Comorbidity with depression. *Biological Psychiatry*. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(93\)90237-8](https://doi.org/10.1016/0006-3223(93)90237-8)
- Miki, Y., Tanji, K., Mori, F., Kakita, A., Takahashi, H., & Wakabayashi, K. (2017). Alteration of mitochondrial protein PDHA1 in Lewy body disease and PARK14. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 489(4), 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.162>
- Miki, Y., Tsushima, E., Foti, S. C., Strand, K. M., Asi, Y. T., Yamamoto, A. K., Bettencourt, C., Oliveira, M. C. B., de Pablo-Fernández, E., Jaunmuktane, Z., Lees, A. J., Wakabayashi, K., Warner, T. T., Quinn, N., Holton, J. L., & Ling, H. (2021). Identification of multiple system atrophy mimicking Parkinson's disease or progressive supranuclear palsy. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awab017>
- Mitchell, T., Lehericy, S., Chiu, S. Y., Strafella, A. P., Stoessl, A. J., & Vaillancourt, D. E. (2021). Emerging Neuroimaging Biomarkers Across Disease Stage in Parkinson Disease. *JAMA Neurology*, 78(10), 1262. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.1312>
- Mizuno, Y., Ikebe, S., Ichirou, Hattori, N., Nakagawa-Hattori, Y., Mochizuki, H., Tanaka, M., & Ozawa, T. (1995). Role of mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *BBA - Molecular Basis of Disease*. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(95\)00038-6](https://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00038-6)
- Mizuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., Takamiya, S., Suzuki, K., Sato, T., Oya, H., Ozawa, T., & Kagawa, Y. (1989). Deficiencies in Complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 163(3), 1450–1455. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91141-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91141-8)
- Mollenhauer, B., Caspell-Garcia, C. J., Coffey, C. S., Taylor, P., Singleton, A., Shaw, L. M., Trojanowski, J. Q., Frasier, M., Simuni, T., Iranzo, A., Oertel, W., Siderowf, A., Weintraub, D., Seibyl, J., Toga, A. W., Tanner, C. M., Kieburtz, K., Chahine, L. M., Marek, K., & Galasko, D. (2019). Longitudinal analyses of cerebrospinal fluid  $\alpha$ -Synuclein in prodromal and early Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 34(9), 1354–1364. <https://doi.org/10.1002/mds.27806>
- Moore, T. J., Glenmullen, J., & Mattison, D. R. (2014). Reports of pathological gambling, hypersexuality, and compulsive shopping associated with dopamine receptor agonist drugs. *JAMA Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.5262>
- Morgan, J. C., & Fox, S. H. (2016). Treating the Motor Symptoms of Parkinson Disease. In *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000355>
- Mou, L., Ding, W., & Fernandez-Funez, P. (2020). Open questions on the nature of Parkinson's disease: from triggers to spreading pathology. *Journal of Medical Genetics*, 57(2). <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106210>
- Mounet, F., Moing, A., Garcia, V., Petit, J., Maucourt, M., Deborde, C., Bernillon, S., le Gall, G., Colquhoun, I., Defernez, M., Giraudel, J.-L., Rolin, D., Rothan, C., & Lemaire-Chamley, M. (2009). Gene and Metabolite Regulatory Network Analysis of Early Developing Fruit Tissues Highlights New Candidate Genes for the Control of Tomato Fruit Composition and Development. *Plant Physiology*, 149(3), 1505–1528. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133967>

- Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., Romo-Madero, S., Suárez-Luna, N., Bermejo-Navas, A., Rodríguez-Gómez, J. A., Garrido-Gil, P., Labandeira-García, J. L., Echevarría, M., López-Barneo, J., & Toledo-Aral, J. J. (2016). Chronic and progressive Parkinson's disease MPTP model in adult and aged mice. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.13409>
- Murali Mahadevan, H., Hashemiaghdam, A., Ashrafi, G., & Harbauer, A. B. (2021). Mitochondria in Neuronal Health: From Energy Metabolism to Parkinson's Disease. *Advanced Biology*, 5(9), 2100663. <https://doi.org/10.1002/adbi.202100663>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Mustapha, M., & Taib, C. N. M. (2021). MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction for therapeutic strategies. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.5181>
- Nagesh Babu, G., Gupta, M., Paliwal, V. K., Singh, S., Chatterji, T., & Roy, R. (2018). Serum metabolomics study in a group of Parkinson's disease patients from northern India. *Clinica Chimica Acta*, 480(January), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.022>
- Nicholson, J. K., Connelly, J., Lindon, J. C., & Holmes, E. (2002). Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function. In *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd728>
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., & Holmes, E. (1999). "Metabonomics": Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. In *Xenobiotica*. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>
- Norwitz, N. G., Hu, M. T., & Clarke, K. (2019). The mechanisms by which the ketone body d- $\beta$ -hydroxybutyrate may improve the multiple cellular pathologies of parkinson's disease. In *Frontiers in Nutrition*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00063>
- Öhman, A., & Forsgren, L. (2015). NMR metabonomics of cerebrospinal fluid distinguishes between Parkinson's disease and controls. *Neuroscience Letters*, 594, 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.051>
- Ojano-Dirain, C., Glushakova, L. G., Zhong, L., Zolotukhin, S., Muzyczka, N., Srivastava, A., & Stacpoole, P. W. (2010). An animal model of PDH deficiency using AAV8-siRNA vector-mediated knockdown of pyruvate dehydrogenase E1 $\alpha$ . *Molecular Genetics and Metabolism*, 101(2–3), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.07.008>
- Olanow, C. W., Kieburtz, K., & Schapira, A. H. v. (2008). Why have we failed to achieve neuroprotection in Parkinson's disease? In *Annals of Neurology* (Vol. 64, Issue SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1002/ana.21461>
- Oliveras-Salvá, M., van der Perren, A., Casadei, N., Stroobants, S., Nuber, S., D'Hooge, R., van den Haute, C., & Baekelandt, V. (2013). RAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-44>
- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M.-J., Lévesque, M., Slack, R. S., & Trudeau, L.-É. (2015). Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current Biology*, 25(18), 2349–2360. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.050>
- Palfi, S., Gurruchaga, J. M., Lepetit, H., Howard, K., Ralph, G. S., Mason, S., Gouello, G., Domenech, P., Buttery, P. C., Hantraye, P., Tuckwell, N. J., Barker, R. A., &

- Mitrophanous, K. A. (2018). Long-Term Follow-Up of a Phase I/II Study of ProSavin, a Lentiviral Vector Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Human Gene Therapy Clinical Development*. <https://doi.org/10.1089/humc.2018.081>
- Palfi, S., Gurruchaga, J. M., Scott Ralph, G., Lepetit, H., Lavisse, S., Buttery, P. C., Watts, C., Miskin, J., Kelleher, M., Deeley, S., Iwamuro, H., Lefaucheur, J. P., Thiriez, C., Fenelon, G., Lucas, C., Brugières, P., Gabriel, I., Abhay, K., Drouot, X., ... Mitrophanous, K. A. (2014). Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: A dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61939-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61939-X)
- Parent, A., & Cicchetti, F. (1998). The current model of basal ganglia organization under scrutiny. In *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.870130202>
- Parent, A., & Hazrati, L. N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. In *Brain Research Reviews*. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)00007-C](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00007-C)
- Park, J., Coddington, L. T., & Dudman, J. T. (2020). Basal Ganglia Circuits for Action Specification. In *Annual Review of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050452>
- Park, J.-H., Burgess, J. D., Farooqi, A. H., DeMeo, N. N., Fiesel, F. C., Springer, W., Delenclos, M., & McLean, P. J. (2020). Alpha-synuclein-induced mitochondrial dysfunction is mediated via a sirtuin 3-dependent pathway. *Molecular Neurodegeneration*, *15*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0349-x>
- Park, S., Jeon, J.-H., Min, B.-K., Ha, C.-M., Thoudam, T., Park, B.-Y., & Lee, I.-K. (2018). Role of the Pyruvate Dehydrogenase Complex in Metabolic Remodeling: Differential Pyruvate Dehydrogenase Complex Functions in Metabolism. *Diabetes & Metabolism Journal*, *42*(4), 270. <https://doi.org/10.4093/dmj.2018.0101>
- Parkkinen, L., Pirttilä, T., & Alafuzoff, I. (2008). Applicability of current staging/categorization of  $\alpha$ -synuclein pathology and their clinical relevance. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0346-6>
- Pathan, M., Wu, J., Lakso, H.-Å., Forsgren, L., & Öhman, A. (2021). Plasma Metabolite Markers of Parkinson's Disease and Atypical Parkinsonism. *Metabolites*, *11*(12), 860. <https://doi.org/10.3390/metabo11120860>
- Patterson, J. R., Duffy, M. F., Kemp, C. J., Howe, J. W., Collier, T. J., Stoll, A. C., Miller, K. M., Patel, P., Levine, N., Moore, D. J., Luk, K. C., Fleming, S. M., Kanaan, N. M., Paumier, K. L., El-Agnaf, O. M. A., & Sortwell, C. E. (2019). Time course and magnitude of alpha-synuclein inclusion formation and nigrostriatal degeneration in the rat model of synucleinopathy triggered by intrastriatal  $\alpha$ -synuclein preformed fibrils. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104525>
- Paumier, K. L., Luk, K. C., Manfredsson, F. P., Kanaan, N. M., Lipton, J. W., Collier, T. J., Steece-Collier, K., Kemp, C. J., Celano, S., Schulz, E., Sandoval, I. M., Fleming, S., Dirr, E., Polinski, N. K., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., & Sortwell, C. E. (2015). Intrastriatal injection of pre-formed mouse  $\alpha$ -synuclein fibrils into rats triggers  $\alpha$ -synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.06.003>
- Pavese, N., Rivero-Bosch, M., Lewis, S. J., Whone, A. L., & Brooks, D. J. (2011). Progression of monoaminergic dysfunction in Parkinson's disease: A longitudinal 18F-dopa PET study. *NeuroImage*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.03.012>

- Pedersen, K. F., Larsen, J. P., Alves, G., & Aarsland, D. (2009). Prevalence and clinical correlates of apathy in Parkinson's disease: A community-based study. *Parkinsonism and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.07.006>
- Peelaerts, W., Bergkvist, L., George, S., Johnson, M., Meyerdirk, L., Ku, E., Steiner, J. A., Madaj, Z., Ma, J., Becker, K., Peter, K., Nilsson, R., Colca, J., & Brundin, P. (2020). Inhibiting the mitochondrial pyruvate carrier does not ameliorate synucleinopathy in the absence of inflammation or metabolic deficits. *BioRxiv*.
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>
- Perlmutter, J. S. (2009). Assessment of parkinson disease manifestations. In *Current Protocols in Neuroscience*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns1001s49>
- Peters, A. (2011). The selfish brain: Competition for energy resources. *American Journal of Human Biology*, 23(1), 29–34. <https://doi.org/10.1002/ajhb.21106>
- Petit, G. H., Berkovich, E., Hickery, M., Kallunki, P., Fog, K., Fitzer-Attas, C., & Brundin, P. (2013). Rasagiline Ameliorates Olfactory Deficits in an Alpha-Synuclein Mouse Model of Parkinson's Disease. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060691>
- Peto, V., Jenkinson, C., & Fitzpatrick, R. (1998). PDQ-39: a review of the development, validation and application of a Parkinson's disease quality of life questionnaire and its associated measures. *Journal of Neurology*, 245(S1), S10–S14. <https://doi.org/10.1007/PL00007730>
- Pfeiffer, R. F. (2011). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. In *Parkinsonism and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.08.003>
- Plewa, S., Poplawska-Domaszewicz, K., Florczak-Wyspianska, J., Klupczynska-Gabryszak, A., Sokol, B., Milytk, W., Jankowski, R., Kozubski, W., Kokot, Z., & Matysiak, J. (2021). The Metabolomic Approach Reveals the Alteration in Human Serum and Cerebrospinal Fluid Composition in Parkinson's Disease Patients. *Pharmaceuticals*, 14(9), 935. <https://doi.org/10.3390/ph14090935>
- Poewe, W., & Seppi, K. (2001). Treatment options for depression and psychosis in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Supplement*. <https://doi.org/10.1007/pl00007821>
- Polinski, N. K. (2021). A Summary of Phenotypes Observed in the in Vivo Rodent Alpha-Synuclein Preformed Fibril Model. In *Journal of Parkinson's Disease*. <https://doi.org/10.3233/jpd-212847>
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Pontone, G. M., Williams, J. R., Anderson, K. E., Chase, G., Goldstein, S. A., Grill, S., Hirsch, E. S., Lehmann, S., Little, J. T., Margolis, R. L., Rabins, P. v., Weiss, H. D., & Marsh, L. (2009). Prevalence of anxiety disorders and anxiety subtypes in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.22611>
- Pontone, G. M., Williams, J. R., Anderson, K. E., Chase, G., Goldstein, S. R., Grill, S., Hirsch, E. S., Lehmann, S., Little, J. T., Margolis, R. L., Rabins, P. v., Weiss, H. D., & Marsh, L. (2011).



- Anxiety and self-perceived health status in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.01.005>
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., & Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. In *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.26424>
- Postuma, R. B., Poewe, W., Litvan, I., Lewis, S., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Chan, P., Slow, E., Seppi, K., Schaffer, E., Rios-Romenets, S., Mi, T., Maetzler, C., Li, Y., Heim, B., Bledsoe, I. O., & Berg, D. (2018). Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 33(10). <https://doi.org/10.1002/mds.27362>
- Potashkin, J. A., Blume, S. R., & Runkle, N. K. (2011). Limitations of Animal Models of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease, 2011*, 1–7. <https://doi.org/10.4061/2011/658083>
- Pouclet, H., Lebouvier, T., Flamant, M., Coron, E., Neunlist, M., Derkinderen, P., & Rouaud, T. (2012). Système nerveux autonome : une source de biomarqueurs dans la maladie de Parkinson. *La Presse Médicale*, 41(7–8), 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2011.11.018>
- Powers, R., Lei, S., Anandhan, A., Marshall, D. D., Worley, B., Cerny, R. L., Dodds, E. D., Huang, Y., Panayiotidis, M. I., Pappa, A., & Franco, R. (2017). Metabolic investigations of the molecular mechanisms associated with Parkinson's disease. In *Metabolites*. <https://doi.org/10.3390/metabo7020022>
- Prange, S., Pagonabarraga, J., Krack, P., Kulisevsky, J., Sgambato, V., Tremblay, L., Thobois, S., & Broussolle, E. (2018). Historical crossroads in the conceptual delineation of apathy in Parkinson's disease. In *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awx362>
- Prange, S., & Thobois, S. (2020). Utilisation de l'imagerie cérébrale dans notre pratique face à un syndrome parkinsonien. *Pratique Neurologique - FMC*, 11(2), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.praneu.2020.01.001>
- Prigione, A., Begni, B., Galbussera, A., Beretta, S., Brighina, L., Garofalo, R., Andreoni, S., Piolti, R., & Ferrarese, C. (2006). Oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease: Negative correlation with levodopa dosage. *Neurobiology of Disease*, 23(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.01.013>
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T. D. L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. In *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.25945>
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Jakowec, M., Petzinger, G., Miller, R., & Akram, M. (2001). The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): A technical review of its utility and safety. In *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00183.x>
- Puchalska, P., & Crawford, P. A. (2017). Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. In *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.022>
- Quansah, E., Peelaerts, W., Langston, J. W., Simon, D. K., Colca, J., & Brundin, P. (2018). Targeting energy metabolism via the mitochondrial pyruvate carrier as a novel approach to attenuate neurodegeneration. In *Molecular Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0260-x>

- Quinones, M. P., & Kaddurah-Daouk, R. (2009). Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 35, Issue 2, pp. 165–176). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.02.019>
- Rabinowitz, J. D., & Enerbäck, S. (2020). Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nature Metabolism*, 2(7), 566–571. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0243-4>
- Rajput, A. H., & Rajput, A. (2014). Accuracy of Parkinson disease diagnosis unchanged in 2 decades. *Neurology*, 83(5), 386–387. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000653>
- Rascol, O., Brooks, D. J., Korczyn, A. D., de Deyn, P. P., Clarke, C. E., & Lang, A. E. (2000). A Five-Year Study of the Incidence of Dyskinesia in Patients with Early Parkinson's Disease Who Were Treated with Ropinirole or Levodopa. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejm200005183422004>
- Reichmann, H., Bilsing, A., Ehret, R., Greulich, W., Schulz, J. B., Schwartz, A., & Rascol, O. (2006). Ergoline and non-ergoline derivatives in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-4009-z>
- Reijnders, J. S. A. M., Ehart, U., Weber, W. E. J., Aarsland, D., & Leentjens, A. F. G. (2008). A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. In *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.21803>
- Rentsch, P., Stayte, S., Morris, G. P., & Vissel, B. (2019). Time dependent degeneration of the nigrostriatal tract in mice with 6-OHDA lesioned medial forebrain bundle and the effect of activin A on l-Dopa induced dyskinesia. *BMC Neuroscience*. <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0487-7>
- Rezzi, S., Ramadan, Z., Martin, F.-P. J., Fay, L. B., van Bladeren, P., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., & Kochhar, S. (2007). Human Metabolic Phenotypes Link Directly to Specific Dietary Preferences in Healthy Individuals. *Journal of Proteome Research*, 6(11), 4469–4477. <https://doi.org/10.1021/pr070431h>
- Rizzo, G., Copetti, M., Arcuti, S., Martino, D., Fontana, A., & Logroscino, G. (2016). Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002350>
- Roberts, E. L. (2007). The support of energy metabolism in the central nervous system with substrates other than glucose. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Brain Energetics. Integration of Molecular and Cellular Processes*. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-30411-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30411-3_7)
- Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2007). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04699.x>
- Roede, J. R., Uppal, K., Park, Y., Lee, K., Tran, V., Walker, D., Strobel, F. H., Rhodes, S. L., Ritz, B., & Jones, D. P. (2013). Serum Metabolomics of Slow vs. Rapid Motor Progression Parkinson's Disease: a Pilot Study. *PLoS ONE*, 8(10), e77629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077629>
- Rogatzki, M. J., Ferguson, B. S., Goodwin, M. L., & Gladden, L. B. (2015). Lactate is always the end product of glycolysis. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00022>
- Rose, J., Brian, C., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., & Franco, R. (2020). Mitochondrial Metabolism in Astrocytes Regulates Brain Bioenergetics, Neurotransmission and Redox Balance. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.536682>

- Rosenblad, C. (1999). Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *European Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00566.x>
- Rosenblad, C., Martinez-Serrano, A., & Björklund, A. (1997). Intrastratial glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of parkinson's disease. *Neuroscience*.  
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00269-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00269-8)
- Samii, A., Nutt, J. G., & Ransom, B. R. (2004). Parkinson's disease. *The Lancet*, 363, 1783–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16305-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16305-8)
- Sanchez, G., Varaschin, R. K., Büeler, H., Marcogliese, P. C., Park, D. S., & Trudeau, L. E. (2014). Unaltered striatal dopamine release levels in young Parkin knockout, Pink1 knockout, DJ-1 knockout and LRRK2 R1441G transgenic mice. *PLoS ONE*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094826>
- Scarpulla, R. C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(7), 1269–1278. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.019>
- Schapira, A. H. v., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 54(3), 823–827. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x>
- Schmidt, N., & Ferger, B. (2001). Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. In *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s007020100004>
- Schneider, J. S., & Pope-Coleman, A. (1995). Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey. *Neurodegeneration*.  
[https://doi.org/10.1016/1055-8330\(95\)90014-4](https://doi.org/10.1016/1055-8330(95)90014-4)
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. In *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0938-y>
- Schönfeld, P., & Reiser, G. (2013). Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy-Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*.  
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128>
- Schwab, A. D., Thurston, M. J., Machhi, J., Olson, K. E., Namminga, K. L., Gendelman, H. E., & Mosley, R. L. (2020). Immunotherapy for Parkinson's disease. In *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104760>
- Schweitzer, J. S., Song, B., Herrington, T. M., Park, T.-Y., Lee, N., Ko, S., Jeon, J., Cha, Y., Kim, K., Li, Q., Henchcliffe, C., Kaplitt, M., Neff, C., Rapalino, O., Seo, H., Lee, I.-H., Kim, J., Kim, T., Petsko, G. A., ... Kim, K.-S. (2020). Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*.  
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1915872>
- Sedlmeier, A., Kluttig, A., Giegling, I., Prehn, C., Adamski, J., Kastenmüller, G., & Lacruz, M. E. (2018). The human metabolic profile reflects macro- and micronutrient intake distinctly according to fasting time. *Scientific Reports*, 8(1), 12262.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-30764-4>
- Selvaraj, S., & Piramanayagam, S. (2019). Impact of gene mutation in the development of Parkinson's disease. In *Genes and Diseases*.  
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.01.004>

- Seo, J., Lee, Y., Kim, B. S., Park, J., Yang, S., Yoon, H.-J., Yoo, J., Park, H. S., Hong, J.-J., Koo, B.-S., Baek, S. H., Jeon, C.-Y., Huh, J.-W., Kim, Y.-H., Park, S. J., Won, J., Ahn, Y.-J., Kim, K., Jeong, K. J., ... Lee, S.-R. (2019). A non-human primate model for stable chronic Parkinson's disease induced by MPTP administration based on individual behavioral quantification. *Journal of Neuroscience Methods*, *311*, 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.10.037>
- Shao, Y., & Le, W. (2019). Recent advances and perspectives of metabolomics-based investigations in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0304-2>
- Shimozawa, A., Ono, M., Takahara, D., Tarutani, A., Imura, S., Masuda-Suzukake, M., Higuchi, M., Yanai, K., Hisanaga, S. I., & Hasegawa, M. (2017). Propagation of pathological  $\alpha$ -synuclein in marmoset brain. *Acta Neuropathologica Communications*. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0413-0>
- Silva Elipe, M. V. (2003). Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. *Analytica Chimica Acta*, *497*(1–2), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.08.048>
- Sinclair, E., Trivedi, D. K., Sarkar, D., Walton-Doyle, C., Milne, J., Kunath, T., Rijs, A. M., de Bie, R. M. A., Goodacre, R., Silverdale, M., & Barran, P. (2021). Metabolomics of sebum reveals lipid dysregulation in Parkinson's disease. *Nature Communications*, *12*(1), 1592. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21669-4>
- Sjöström, H., Granberg, T., Westman, E., & Svenningsson, P. (2017). Quantitative susceptibility mapping differentiates between parkinsonian disorders. *Parkinsonism and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.08.029>
- Smith, A. M., Depp, C., Ryan, B. J., Johnston, G. I., Alegre-Abarrategui, J., Evetts, S., Rolinski, M., Baig, F., Ruffmann, C., Simon, A. K., Hu, M. T. M., & Wade-Martins, R. (2018). Mitochondrial dysfunction and increased glycolysis in prodromal and early Parkinson's blood cells. *Movement Disorders*, *33*(10), 1580–1590. <https://doi.org/10.1002/mds.104>
- Song, Z., Wang, H., Yin, X., Deng, P., & Jiang, W. (2019). Application of NMR metabolomics to search for human disease biomarkers in blood. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, *57*(4), 417–441. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0380>
- Sotelo-Orozco, J., Chen, S.-Y., Hertz-Picciotto, I., & Slupsky, C. M. (2021). A Comparison of Serum and Plasma Blood Collection Tubes for the Integration of Epidemiological and Metabolomics Data. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.682134>
- Starkstein, S. E., & Brockman, S. (2011). Apathy and Parkinson's disease. *Current Treatment Options in Neurology*. <https://doi.org/10.1007/s11940-011-0118-9>
- Stevens, V. L., Hoover, E., Wang, Y., & Zanetti, K. A. (2019). Pre-Analytical Factors that Affect Metabolite Stability in Human Urine, Plasma, and Serum: A Review. *Metabolites*, *9*(8), 156. <https://doi.org/10.3390/metabo9080156>
- Stocchi, F. (2009). Dopamine receptor agonists in the treatment of advanced Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70836-3](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70836-3)
- Stocchi, F. (2013). Therapy for Parkinson's Disease : What is in the Pipeline ? *Neurotherapeutics*, *11*, 24–33. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0242-1>
- Stoessel, D., Schulte, C., Teixeira dos Santos, M. C., Scheller, D., Rebollo-Mesa, I., Deuschle, C., Walther, D., Schauer, N., Berg, D., Nogueira da Costa, A., & Maetzler, W. (2018).

- Promising Metabolite Profiles in the Plasma and CSF of Early Clinical Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00051>
- Südmeyer, M., Antke, C., Zizek, T., Beu, M., Nikolaus, S., Wojtecki, L., Schnitzler, A., & Müller, H.-W. (2011). Diagnostic Accuracy of Combined FP-CIT, IBZM, and MIBG Scintigraphy in the Differential Diagnosis of Degenerative Parkinsonism: A Multidimensional Statistical Approach. *Journal of Nuclear Medicine*, *52*(5), 733–740. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.086959>
- Sullivan, A. M., & O'Keefe, G. W. (2016). Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease: Past, present and future. *Neural Regeneration Research*. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.177710>
- Sumner, L. W., Mendes, P., & Dixon, R. A. (2003). Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era. In *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00708-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00708-2)
- Supandi, F., & van Beek, J. H. G. M. (2018). Computational prediction of changes in brain metabolic fluxes during Parkinson's disease from mRNA expression. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203687>
- Surmeier, D. J., Obeso, J. A., & Halliday, G. M. (2017). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. In *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.178>
- Taguchi, T., Ikuno, M., Yamakado, H., & Takahashi, R. (2020). Animal Model for Prodromal Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(6), 1961. <https://doi.org/10.3390/ijms21061961>
- Tang, B. L. (2019). Targeting the mitochondrial pyruvate carrier for neuroprotection. In *Brain Sciences*. <https://doi.org/10.3390/brainsci9090238>
- Tarazi, F. I., Sahli, Z. T., Wolny, M., & Mousa, S. A. (2014). Emerging therapies for Parkinson's disease: From bench to bedside. In *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.05.010>
- Teahan, O., Gamble, S., Holmes, E., Waxman, J., Nicholson, J. K., Bevan, C., & Keun, H. C. (2006). Impact of analytical bias in metabolomic studies of human blood serum and plasma. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac051972y>
- Teul, J., Rupérez, F. J., Garcia, A., Vaysse, J., Balayssac, S., Gilard, V., Malet-Martino, M., Martin-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L. M., Tuñón, J., Egido, J., & Barbas, C. (2009). Improving Metabolite Knowledge in Stable Atherosclerosis Patients by Association and Correlation of GC-MS and <sup>1</sup>H NMR Fingerprints. *Journal of Proteome Research*, *8*(12), 5580–5589. <https://doi.org/10.1021/pr900668v>
- Thiele, I., Sahoo, S., Heinken, A., Hertel, J., Heirendt, L., Aurich, M. K., & Fleming, R. M. (2020). Personalized whole-body models integrate metabolism, physiology, and the gut microbiome. *Molecular Systems Biology*, *16*(5). <https://doi.org/10.15252/msb.20198982>
- Thiruchelvam, M. J., Powers, J. M., Cory-Slechta, D. A., & Richfield, E. K. (2004). Risk factors for dopaminergic neuron loss in human  $\alpha$ -synuclein transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03139.x>
- Thobois, S., Ardouin, C., Lhommée, E., Klinger, H., Lagrange, C., Xie, J., Fraix, V., Coelho Braga, M. C., Hassani, R., Kistner, A., Juphard, A., Seigneuret, E., Chabardes, S., Mertens, P., Polo, G., Reilhac, A., Costes, N., Lebars, D., Savasta, M., ... Krack, P. (2010). Non-motor dopamine withdrawal syndrome after surgery for Parkinson's disease: Predictors and underlying mesolimbic denervation. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awq032>

- Thobois, S., Danaila, T., Scheiber, C., & Broussolle, E. (2014). Place de l'imagerie dans les syndromes parkinsoniens Interest of imaging techniques in parkinsonian syndromes. In *La Lettre du Neurologue* •.
- Tieu, K. (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009316>
- Tieu, K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D. C., Yan, S. du, Naini, A., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ramasamy, R., & Przedborski, S. (2003a). D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI200318797>
- Tieu, K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D. C., Yan, S. du, Naini, A., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ramasamy, R., & Przedborski, S. (2003b). D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI200318797>
- Tieu, K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D.-C., Yan, S.-D., Naini, A., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ramasamy, R., & Przedborski, S. (2003c). D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *Journal of Clinical Investigation*, 112(6), 892–901. <https://doi.org/10.1172/JCI18797>
- Tilgner, M., Vater, T. S., Habel, P., & Cheng, L. L. (2019). *High-Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) NMR Methods in Metabolomics* (pp. 49–67). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9690-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9690-2_4)
- Toczyłowska, B., Zieminska, E., Michałowska, M., Chalimoniuk, M., & Fiszer, U. (2020). Changes in the metabolic profiles of the serum and putamen in Parkinson's disease patients – In vitro and in vivo NMR spectroscopy studies. *Brain Research*, 1748, 147118. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147118>
- Tolosa, E., Compta, Y., & Gaig, C. (2007). The premotor phase of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 13, S2–S7. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2007.06.007>
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 20(5), 385–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)
- Trezzi, J. P., Galozzi, S., Jaeger, C., Barkovits, K., Brockmann, K., Maetzler, W., Berg, D., Marcus, K., Betsou, F., Hiller, K., & Mollenhauer, B. (2017). Distinct metabolomic signature in cerebrospinal fluid in early parkinson's disease. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.27132>
- Triba, M. N., le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., Rutledge, D. N., & Savarin, P. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular BioSystems*, 11(1), 13–19. <https://doi.org/10.1039/C4MB00414K>
- Trupp, M., Jonsson, P., Ohrfelt, A., Zetterberg, H., Obudulu, O., Malm, L., Wuolikainen, A., Linder, J., Moritz, T., Blennow, K., Antti, H., & Forsgren, L. (2014). Metabolite and peptide levels in plasma and CSF differentiating healthy controls from patients with newly diagnosed Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 4(3), 549–560. <https://doi.org/10.3233/JPD-140389>
- Trygg, J., & Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics*, 16(3), 119–128. <https://doi.org/10.1002/cem.695>

- Turner, R. S., & Desmurget, M. (2010). Basal ganglia contributions to motor control: A vigorous tutor. In *Current Opinion in Neurobiology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.022>
- Tyurina, Y. Y., Polimova, A. M., Maciel, E., Tyurin, V. A., Kapralova, V. I., Winnica, D. E., Vikulina, A. S., Domingues, M. R. M., McCoy, J., Sanders, L. H., Bayir, H., Greenamyre, J. T., & Kagan, V. E. (2015). LC/MS analysis of cardiolipins in substantia nigra and plasma of rotenone-treated rats: Implication for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Free Radical Research*. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1005085>
- Ueno, S.-I., Saiki, S., Fujimaki, M., Takeshige-Amano, H., Hatano, T., Oyama, G., Ishikawa, K.-I., Yamaguchi, A., Nojiri, S., Akamatsu, W., & Hattori, N. (2018). Zonisamide Administration Improves Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation in Parkinson's Disease. *Cells*, 8(1), 14. <https://doi.org/10.3390/cells8010014>
- Ungerstedt, U. (1968). 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7)
- Vacanti, N. M., Divakaruni, A. S., Green, C. R., Parker, S. J., Henry, R. R., Ciaraldi, T. P., Murphy, A. N., & Metallo, C. M. (2014). Regulation of substrate utilization by the mitochondrial pyruvate carrier. *Molecular Cell*, 56(3), 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.024>
- Vachez, Y., Carcenac, C., Magnard, R., Kerkerian-Le Goff, L., Salin, P., Savasta, M., Carnicella, S., & Boulet, S. (2020). Subthalamic Nucleus Stimulation Impairs Motivation: Implication for Apathy in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.27953>
- Vamecq, J., Maurois, P., Bac, P., Delplanque, B., & Pages, N. (2007). Ketogenic diet and astrocyte/neuron metabolic interactions. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 14(3–4), 208–213. <https://doi.org/10.1051/ocl.2007.0124>
- Vermilyea, S. C., & Emborg, M. E. (2018). The role of nonhuman primate models in the development of cell-based therapies for Parkinson's disease. In *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1708-9>
- Veyres, N., Hamadjida, A., & Huot, P. (2018). Predictive Value of Parkinsonian Primates in Pharmacologic Studies: A Comparison between the Macaque, Marmoset, and Squirrel Monkey. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 365(2), 379–397. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.247171>
- Vicario, M., Cieri, D., Brini, M., & Cali, T. (2018). The Close Encounter Between Alpha-Synuclein and Mitochondria. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00388>
- Vijayakumar, D., & Jankovic, J. (2016). Drug-Induced Dyskinesia, Part 1: Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesia. In *Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0566-3>
- Villalba, R. M., Lee, H., & Smith, Y. (2009). Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Experimental Neurology*, 215(2), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.09.025>
- VITTE, J., MICHEL, B. F., BONGRAND, P., & GASTAUT, J.-L. (2004). Oxidative Stress Level in Circulating Neutrophils Is Linked to Neurodegenerative Diseases. *Journal of Clinical Immunology*, 24(6), 683–692. <https://doi.org/10.1007/s10875-004-6243-4>
- Volkenhoff, A., Weiler, A., Letzel, M., Stehling, M., Klämbt, C., & Schirmeier, S. (2015). Glial glycolysis is essential for neuronal survival in drosophila. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.006>

- Vos, M., Dulovic-Mahlow, M., Mandik, F., Frese, L., Kanana, Y., Haissatou Diaw, S., Depperschmidt, J., Böhm, C., Rohr, J., Lohnau, T., König, I. R., & Klein, C. (2021). Ceramide accumulation induces mitophagy and impairs  $\beta$ -oxidation in PINK1 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(43), e2025347118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025347118>
- Walusinski, O. (2018). Jean-Martin Charcot and Parkinson's disease: Teaching and teaching materials. In *Revue Neurologique*. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.08.005>
- Wang, L., Magen, I., Yuan, P. Q., Subramaniam, S. R., Richter, F., Chesselet, M. F., & Taché, Y. (2012). Mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein display alterations in colonic myenteric ganglia and defecation. *Neurogastroenterology and Motility*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01974.x>
- Warren Olanow, C., Bartus, R. T., Baumann, T. L., Factor, S., Boulis, N., Stacy, M., Turner, D. A., Marks, W., Larson, P., Starr, P. A., Jankovic, J., Simpson, R., Watts, R., Guthrie, B., Poston, K., Henderson, J. M., Stern, M., Baltuch, G., Goetz, C. G., ... Lang, A. E. (2015). Gene delivery of neurturin to putamen and substantia nigra in Parkinson disease: A double-blind, randomized, controlled trial. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.24436>
- Weisskopf, M. G., Chen, H., Schwarzschild, M. A., Kawachi, I., & Ascherio, A. (2003). Prospective study of phobic anxiety and risk of Parkinson's disease. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.10425>
- Weng, M., Xie, X., Liu, C., Lim, K.-L., Zhang, C., & Li, L. (2018). The Sources of Reactive Oxygen Species and Its Possible Role in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease, 2018*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/9163040>
- William Langston, J., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.6823561>
- William Langston, J., Forno, L. S., Rebert, C. S., & Irwin, I. (1984). Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90777-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90777-7)
- Willkommen, D., Lucio, M., Moritz, F., Forcisi, S., Kanawati, B., Smirnov, K. S., Schroeter, M., Sigaroudi, A., Schmitt-Kopplin, P., & Michalke, B. (2018). Metabolomic investigations in cerebrospinal fluid of Parkinson's disease. *PLOS ONE*, *13*(12), e0208752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208752>
- Wishart, D. S. (2016). Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *15*(7), 473–484. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.32>
- Wishart, D. S. (2019). Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2018>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., ... Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorn Dahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., ... Scalbert, A. (2013). HMDB 3.0-The Human



- Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1065>
- Włodarek, D. (2019). Role of ketogenic diets in neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and parkinson's disease). In *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu11010169>
- Wold, S. (1978). Cross-Validatory Estimation of the Number of Components in Factor and Principal Components Models. *Technometrics*, 20(4), 397.  
<https://doi.org/10.2307/1267639>
- Worley, B., & Powers, R. (2012). Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>
- Worth, A. J., Basu, S. S., Snyder, N. W., Mesaros, C., & Blair, I. A. (2014). Inhibition of neuronal cell mitochondrial complex i with rotenone increases lipid  $\beta$ -oxidation, supporting acetyl-coenzyme a levels. *Journal of Biological Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.591354>
- Ximenes, J. C. M., Neves, K. R. T., Leal, L. K. A. M., do Carmo, M. R. S., Brito, G. A. de C., Naffah-Mazzacoratti, M. da G., Cavalheiro, É. A., & Viana, G. S. de B. (2015). Valproic Acid Neuroprotection in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease Is Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and HDAC Inhibitory Properties. *Journal of Neurodegenerative Diseases*. <https://doi.org/10.1155/2015/313702>
- Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., Ghoorah, D., Kong, X., Lin, Z., & Wang, T. (2012). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. In *Critical Reviews in Toxicology*.  
<https://doi.org/10.3109/10408444.2012.680431>
- Yang, J. R., Lin, Y. T., & Liao, C. H. (2011). Application of Embryonic Stem Cells on Parkinson's Disease Therapy. In *Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences*.  
[https://doi.org/10.1016/S2211-4254\(11\)60004-6](https://doi.org/10.1016/S2211-4254(11)60004-6)
- Yang, Q., Zhang, A. H., Miao, J. H., Sun, H., Han, Y., Yan, G. L., Wu, F. F., & Wang, X. J. (2019). Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: A systematic review. In *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/c9ra06697g>
- Yang, X., & Cheng, B. (2010). Neuroprotective and anti-inflammatory activities of ketogenic diet on MPTP-induced neurotoxicity. *Journal of Molecular Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1007/s12031-010-9336-y>
- Yanibada, B., Boudra, H., Debrauwer, L., Martin, C., Morgavi, D. P., & Canlet, C. (2018). Evaluation of sample preparation methods for NMR-based metabolomics of cow milk. *Heliyon*, 4(10), e00856. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00856>
- Yin, P., Peter, A., Franken, H., Zhao, X., Neukamm, S. S., Rosenbaum, L., Lucio, M., Zell, A., Häring, H.-U., Xu, G., & Lehmann, R. (2013). Preanalytical Aspects and Sample Quality Assessment in Metabolomics Studies of Human Blood. *Clinical Chemistry*, 59(5), 833–845. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.199257>
- Yu, Z., Kastenmüller, G., He, Y., Belcredi, P., Möller, G., Prehn, C., Mendes, J., Wahl, S., Roemisch-Margl, W., Ceglarek, U., Polonikov, A., Dahmen, N., Prokisch, H., Xie, L., Li, Y., Wichmann, H. E., Peters, A., Kronenberg, F., Suhre, K., ... Wang-Sattler, R. (2011). Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PLoS ONE*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021230>
- Zaccai, J., Brayne, C., McKeith, I., Matthews, F., & Ince, P. G. (2008). Patterns and stages of  $\alpha$ -synucleinopathy: Relevance in a population-based cohort. *Neurology*.  
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000306697.48738.b6>

- Zarow, C., Lyness, S. A., Mortimer, J. A., & Chui, H. C. (2003). Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Archives of Neurology*. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.3.337>
- Zhang, A., Sun, H., Yan, G., Wang, P., & Wang, X. (2015). Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic. In *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/354671>
- Zhang, J., Xu, C. Y., & Liu, J. (2017). Meta-analysis on the prevalence of REM sleep behavior disorder symptoms in Parkinson's disease. *BMC Neurology*. <https://doi.org/10.1186/s12883-017-0795-4>
- Zhao, H., Wang, C., Zhao, N., Li, W., Yang, Z., Liu, X., Le, W., & Zhang, X. (2018). Potential biomarkers of Parkinson's disease revealed by plasma metabolic profiling. *Journal of Chromatography B*, 1081–1082, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.01.025>

## Résumé :

La maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative caractérisée par la perte progressive des neurones dopaminergiques de la substantia nigra pars compacta (SNc). Malgré une avancée considérable des traitements proposés aux patients, cette maladie reste à ce jour toujours incurable. Les deux principaux facteurs qui expliquent cet échec thérapeutique sont : i) une compréhension incomplète de la physiopathologie de la MP, et ii) son diagnostic tardif.

En effet, celui-ci est basé sur l'évaluation de symptômes moteurs caractéristiques de la maladie qui apparaissent alors que le processus neurodégénératif est déjà très avancé (50-60% des neurones de la SNc sont déjà morts). Pourtant, il a été montré que les patients atteints de la MP peuvent également présenter des troubles neuropsychiatriques qui apparaissent avant les symptômes moteurs et même dès les phases précoces de la maladie.

De manière intéressante, des altérations du métabolisme cérébral, mais également du métabolisme sanguin, ont été identifiées chez des patients atteints de la MP, et chez des patients présentant des symptômes neuropsychiatriques semblables à ceux observés chez les patients parkinsoniens. A ce jour, aucune étude métabolique ne s'est intéressée spécifiquement aux troubles neuropsychiatriques et à la MP de façon conjointe. La comparaison du profil métabolique à différents stades de la pathologie, et notamment dès les phases précoces, pourrait non seulement servir d'outil diagnostique, mais également permettre d'identifier des cibles pertinentes pour le développement de stratégies thérapeutiques.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail doctoral a été d'étudier les altérations du métabolisme associées aux différentes phases de la maladie, et notamment aux phases précoces.

L'originalité de cette étude repose sur l'utilisation d'échantillons provenant de plusieurs modèles animaux mais également de patients. Ainsi, nous avons conduit des études de métabolomique par résonance magnétique nucléaire (RMN) sur des échantillons de sérum provenant des modèles de rat 6-OHDA, rat alpha-synucléine et de primate non-humain MPTP, mimant différents stades de la maladie, ainsi qu'à partir d'échantillons sanguins provenant de 3 cohortes de patients nouvellement diagnostiqués. Nous avons également analysé des échantillons de striatum de rats 6-OHDA.

La comparaison des dérégulations métaboliques observées chez l'animal et chez l'humain dans le sérum nous a permis de développer un biomarqueur capable de séparer les patients nouvellement diagnostiqués des contrôles avec une grande fiabilité. De même, nous avons montré que notre biomarqueur permettait de clairement séparer les animaux mimant les phases précoces des animaux mimant les phases plus tardives, suggérant ainsi qu'il pourrait être utilisé pour un diagnostic très précoce de la MP.

De plus, certaines des dérégulations que nous avons observées au niveau sanguin, ont également été retrouvées au niveau cérébral. Ceci nous a permis d'émettre des hypothèses mécanistiques quant à la physiopathologie de la MP. Notamment, des altérations associées au métabolisme du pyruvate ont particulièrement retenu notre attention, compte tenu de son implication dans le métabolisme énergétique qui est fortement impacté dans la maladie. Celles-ci nous ont conduit à formuler l'hypothèse que le pyruvate ne serait plus utilisé comme source énergétique préférentielle au sein de la cellule, possiblement à cause d'un blocage au niveau de l'entrée dans la mitochondrie. Pour tester cette hypothèse, nous avons bloqué chez des rats normaux le transporteur mitochondrial du pyruvate (MPC), qui est le seul point d'entrée du pyruvate dans la matrice mitochondriale et joue un rôle crucial dans le métabolisme énergétique. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que le blocage du MPC entraîne une redirection de la production d'énergie cellulaire au profit d'autres sources comme les lipides et les acides aminés. Cette redirection s'accompagnait d'une atténuation des atteintes cellulaires et comportementales chez le rat 6-OHDA, mettant ainsi en lumière les capacités neuroprotectrices du blocage du MPC dans le cadre de la MP.

Ainsi, ce travail a permis de contribuer à mieux comprendre la MP et à la détecter plus précocement afin de pouvoir, à plus long terme, proposer de nouvelles pistes thérapeutiques à visée curative.

## Abstract :

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc). Despite considerable progress in the treatments offered to patients, this disease currently remains incurable. The two main factors that explain this therapeutic failure are: i) an incomplete understanding of the pathophysiology of PD, and ii) its late diagnosis.

Indeed, the diagnosis is based on the evaluation of characteristic motor symptoms of the disease which appear when the neurodegenerative process is already very advanced (50-60% of the neurons of the SNc are already dead). However, it has been shown that PD patients can also present neuropsychiatric disorders that appear before the motor symptoms and even in the early stages of the disease.

Interestingly, alterations in brain metabolism, but also in blood metabolism, have been identified in PD patients, and in patients with similar neuropsychiatric symptoms to those observed in PD patients. To date, no metabolic study has specifically addressed neuropsychiatric disorders and PD in conjunction. The comparison of the metabolic profile at different stages of the disease, and in particular in the early phases, could not only serve as a diagnostic tool, but also allow the identification of relevant targets for the development of therapeutic strategies.

In this context, the objective of this doctoral work was to study the metabolic alterations associated with the different phases of the disease, and particularly the early phases.

The originality of this study relies on the use of samples from several animal models but also from patients. Thus, we conducted nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics studies on serum samples from the 6-OHDA rat, the alpha-synuclein rat and the MPTP non-human primate models, mimicking different stages of the disease, as well as on blood samples from 3 cohorts of newly diagnosed patients. We also analyzed striatum samples from 6-OHDA rats. The comparison of metabolic deregulations observed in animals and humans in serum allowed us to develop a biomarker able to separate newly diagnosed patients from controls with a high degree of reliability. Similarly, we showed that our biomarker clearly separated animals mimicking early phases from animals mimicking later phases, suggesting that it could be used for an early diagnosis of PD.

Moreover, some of dysregulations that we have observed at the blood level were also found at the brain level. This allowed us to make mechanistic hypotheses regarding the pathophysiology of PD.

In particular, alterations associated with pyruvate metabolism have attracted our attention, given its involvement in energy metabolism which is strongly impacted in the disease. These led us to formulate the hypothesis that pyruvate would no longer be used as a preferential energy source within the cell, possibly due to a blockage at the level of entry into the mitochondria. To test this hypothesis, we blocked in normal rats the mitochondrial pyruvate transporter (MPC), which is the sole point of entry of pyruvate into the mitochondrial matrix and plays a crucial role in energy metabolism. Thus, we were able to demonstrate that blocking MPC leads to a redirection of cellular energy production to other sources such as lipids and amino acids. This redirection was accompanied by an attenuation of cellular and behavioral damage in the 6-OHDA rat, thus highlighting the neuroprotective capacities of MPC blockade in PD.

Thus, this work contributed to a better understanding of PD and to detect it earlier in order to be able, in the longer term, to propose new therapeutic strategy with curative aims.