



HAL
open science

Validation de nouveaux modèles et traitements de la maladie de Parkinson chez le primate non-humain

Audrey Fayard

► **To cite this version:**

Audrey Fayard. Validation de nouveaux modèles et traitements de la maladie de Parkinson chez le primate non-humain. Neurosciences. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL100 . tel-03938884

HAL Id: tel-03938884

<https://theses.hal.science/tel-03938884>

Submitted on 14 Jan 2023

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.

Validation de nouveaux modèles et traitements de la maladie de Parkinson chez le primate non-humain

Validation of new models and treatments of Parkinson's disease in the
non-human primate

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 568 : Signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité de doctorat : Science de la vie et de la santé
Graduate School : Sciences de la vie et santé. Référent : Faculté de Médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche LMN (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS),
sous la direction de Philippe HANTRAYE, Directeur de recherche, université Paris-
Saclay, la co-direction de Romina ARON-BADIN, Chargée de recherche, université
Paris-Saclay

Thèse soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 13 décembre 2021, par

Audrey FAYARD

Composition du Jury

Michael SCHUMACHER Directeur de recherche INSERM, UMR1195, université Paris-Saclay	Président
Stephen DUNNETT Professeur émérite, Université de Cardiff	Rapporteur & Examineur
Stéphane PALFI Neurochirurgien, Hôpital Henri-Mondor Créteil	Rapporteur & Examineur
Benjamin DEHAY Chargé de recherche INSERM, UMR 5293, Université de Bordeaux	Examineur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement les membres de mon jury, Stéphane Palfi, Stephen Dunnett, Benjamin Dehay et Michael Schumacher, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je tiens plus particulièrement à remercier Stéphane Palfi et Stephen Dunnett pour leur rôle de rapporteur et Benjamin Dehay pour sa participation à mon comité de suivi de thèse. Merci à tous pour le temps que vous m'avez accordé et l'ensemble des retours que vous avez pu me faire et qui m'ont été d'une grande aide.

Je tiens à remercier très sincèrement mes directeurs de thèse, Philippe et Romina. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en m'engageant en stage de master 2, puis en thèse et maintenant en tant qu'ingénieure. Je me réjouis de pouvoir continuer à travailler à vos côtés. Cette thèse a été marquée par de nombreuses péripéties et challenges, ça n'a pas toujours été facile, mais vous avez toujours été là pour m'aider et me soutenir. Merci pour le temps que vous avez pu m'accorder malgré vos emplois du temps très chargés. Philippe, merci pour vos nombreux conseils toujours si justes et judicieux, ils m'ont été d'une grande aide. Romina, je ne pourrais jamais assez vous remercier. J'ai beaucoup grandi grâce à vous que ce soit scientifiquement, professionnellement ou personnellement.

Merci à la team primate évidemment. Merci Romina, Steven, Sophie et Christophe de m'avoir formée. C'est un monde qui m'était complètement inconnu et qui peut être intimidant au premier abord mais vous m'avez transmis votre passion et maintenant je ne me verrais plus faire autre chose. Sophie merci pour toute ton aide lors de nos nombreuses manip...et surtout les avants et après manip...toutes ces heures passées à réveiller les singes ou encore à préparer des aliquots et étiquettes n'auraient pas été aussi sympa sans toi. C'est tellement agréable de travailler avec quelqu'un d'aussi professionnelle et impliquée que toi. Ton absence ces derniers mois s'est faite ressentir et on a tous hâte que tu reviennes. Merci Christophe pour toute ton aide avec les tests cognitifs. Je pense plus particulièrement à nos galères avec le mobility, les distributeurs, les fils électriques, les caméras et j'en passe (merci à Didier aussi qui nous a beaucoup aidé à ce niveau-là). Merci de me suivre dans mes idées de nouveaux tests ou de friandises.

Merci aux membres du bureau 116 (meilleur bureau de MIRCen) de m'avoir supportée pendant ces quatre ans. Vous êtes géniaux et travailler dans une si bonne ambiance fut un plaisir. On a chacun notre personnalité mais je trouve qu'on se complète parfaitement. Merci Léopold pour ta bonne humeur légendaire... le soleil de MIRCen. Je n'aurais pas pu rêver d'un meilleur voisin de bureau. Merci Mylène pour toutes nos discussions scientifiques ou non, pour nos footings, pour nos japonais, pour bande organisée...que de bons moments, tu vas me manquer et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci au reste de l'équipe expérimentation animale et plus particulièrement à Martine. Merci pour ton aide si précieuse lors des chirurgies, des IRM, des TEP et autres. Merci pour ta bonne humeur et ton calme, c'est toujours un plaisir de travailler avec toi.

Merci à toute la team TEP et en particulier à Sonia. Merci pour ces heures d'acquisition et d'analyse.

Merci à l'équipe d'histologie : Caro, Fanny et Pauline de m'avoir formée aux marquages histologiques et au microscope. Merci d'être toujours disponibles pour m'aider quand j'ai des questions ou problèmes. Vous formez une super équipe et je suis toujours contente de vous croiser et discuter avec vous. Fanny merci pour nos nombreux footings aussi.

Merci à l'équipe IRM : Julien Flament et Céline, pour votre aide lors des examens IRMs, et plus particulièrement Julien Valette, pour ton aide dans l'analyse des données de température. C'est également toujours un plaisir de travailler avec vous tous.

Merci à l'équipe vectorologie et plus particulièrement Alexis et Charlène pour la génération des vecteurs viraux. C'est toujours agréable de travailler avec vous tous.

Merci à Ronald Melki, Luc Bousset et Alexis Fenyi de l'équipe 1 pour notre collaboration sur le projet SUMMA. Merci de m'avoir appris tant de choses sur l'alpha-synucléine et sur les différentes techniques de biochimie.

La super ambiance qui règne à MIRcen est également due aux étudiants. Merci à tous les étudiants passés et actuels pour ces bons moments passés ensemble : Lucie, Laurène, Anastasie, Camille, Francesco, Pauline R, Alix, Maya, Océane, PA, Charlotte, Melissa, Suzanne, JB, Fanny, Pauline, Emma, Mathilde, Yoann...et tous les autres !!

Merci à toutes les autres personnes du laboratoire qui m'ont aidée d'une façon ou d'une autre et notamment Corina, Marie-Laure, Cécile, Laurent, Kristell et Siegfried.

Je voudrais également remercier mes amis « de Nogent » pour leur soutien sans faille. Tout d'abord merci Mathilde. Merci pour ces très très très nombreux et longs vocaux, tu as toujours été là pour m'écouter et me conseiller. Je pense que tu as vécu cette thèse presque comme si c'était la tienne. Ton aide m'a été si précieuse, je t'en remercie infiniment. Merci aussi Thomas pour toujours prendre de mes nouvelles, de toujours être là (autour d'une bière) quand ça va et quand ça va moins bien. Merci à tous les autres : Héloïse, Caroline, Domitille, Alix, Laure, Pauline, Nicolas, Axel, Edward, Godefroy, Alban, Clément M, Clément V, Thomas T...merci d'être là, vous êtes les meilleurs !!!

Je voudrais également remercier mes amis « de Jussieu » : Camille, Gökçe, Manuela, Rachel, Mathilde et Clément. Merci (surtout les filles) pour votre soutien, vous savez ce que c'est de faire une thèse et ça fait du bien de s'entraider. Vous êtes supers et des toutes des exemples pour moi.

Évidemment je remercie aussi ma famille.

Tout d'abord ma belle-famille : Merci pour votre soutien et pour tous ces délicieux repas.

Mes parents : vous dites souvent que vous êtes frustrés de ne pas pouvoir m'aider car vous ne comprenez pas ce que je fais et que vous êtes loin mais en réalité vous m'aidez tellement. Merci pour ces nombreux appels en rentrant le soir, c'est un moment de la journée que je chéris. Merci de m'écouter, de me supporter et surtout de toujours m'encourager. Vous êtes des parents exceptionnels, vraiment. Vous me poussez toujours à aller plus loin avec bienveillance.

Mon frère, ma sœur et Maxence : Merci Claire, pour ton soutien infaillible, que ce soit dans la thèse ou pour le reste. Tu es vraiment un exemple pour moi. Merci Maxence pour ton aide « logistique », prêt à m'aider jusqu'à 3h du matin un dimanche pour des problèmes de mise en page. Merci Nico pour ta bonne humeur, tu me donnes de la force, maintenant c'est à ton tour !

Merci Shaki pour ton réconfort inébranlable.

Enfin Clément : mon plus grand soutien...merci de m'avoir supportée pendant ces quatre ans et je sais que ça n'a pas toujours été facile. Merci d'avoir partagé mes joies et mes déceptions, de m'avoir écoutée pendant des heures, de m'avoir conseillé...je ne sais pas ce que je ferais sans toi...merci d'être là.

TABLE DES MATIERES

Table des matières.....	1
Table des figures.....	4
Table des tableaux.....	8
Table des abréviations.....	9
INTRODUCTION.....	11
1. Généralités sur la maladie de Parkinson : Histoire, épidémiologie et étiologie.....	12
1.1. Histoire de la maladie de Parkinson.....	12
1.2. Épidémiologie de la maladie de Parkinson.....	13
1.3. Étiologie de la maladie de Parkinson.....	13
1.3.1. Les facteurs génétiques.....	14
1.3.2. Les autres facteurs de risque.....	15
2. Physiopathologie de la maladie de Parkinson.....	16
2.1. La dopamine, la voie dopaminergique nigrostriée, et les ganglions de la base.....	16
2.1.1. La dopamine.....	16
2.1.2. Les ganglions de la base.....	19
2.1.3. Les ganglions de la base dans la maladie de Parkinson.....	22
2.2. La pathologie liée à alpha-synucléine.....	23
2.2.1. L'alpha-synucléine.....	23
2.2.2. Les synucléinopathies.....	24
2.2.3. L'hypothèse « prion like ».....	26
3. Symptomatologie de la maladie de Parkinson.....	27
3.1. Les symptômes moteurs.....	28
3.2. Les symptômes non-moteurs.....	30
3.2.1. Les dysfonctionnements sensoriels.....	30
3.2.2. Les dysfonctionnements autonomiques.....	31
3.2.3. Les dysfonctionnements cognitifs.....	31
3.2.4. Les dysfonctionnements psychiatriques.....	32
4. Traitements de la maladie de Parkinson.....	32
4.1. Les pharmacothérapies.....	33
4.2. Les traitements chirurgicaux.....	36
4.3. Les thérapies géniques et cellulaires.....	38
4.4. Les autres types de thérapies.....	39
5. Les modèles animaux de la maladie de Parkinson.....	40
5.1. Les modèles induits par neurotoxines.....	41
5.1.1. Les pesticides et herbicides.....	42
5.1.2. La 6-OHDA.....	42
5.1.3. Le MPTP.....	43

5.2. Les modèles induits par modification génétique.....	43
OBJECTIF	45
PARTIE I : CARACTERISATION DES SYMPTOMES NON-MOTEURS DU MODELE MPTP CHEZ LE PRIMATE NON-HUMAIN	48
1. Contexte	49
1.1. Le mécanisme du MPTP	49
1.2. Le modèle primate MPTP	50
1.3. L'étude des symptômes non-moteurs chez le primate MPTP	53
1.3.1. L'étude des déficits cognitifs.....	53
1.3.2. L'étude des symptômes psychiatriques.....	55
1.3.3. L'étude des déficits autonomiques	56
2. Objectifs	57
3. Protocole expérimental	58
4. Matériel et méthodes	58
4.1. Sujets.....	58
4.2. Intoxication au MPTP	59
4.3. Évaluation du comportement moteur	60
4.4. Évaluation du comportement cognitif	61
4.4.1. Test de discrimination visuelle.....	61
4.4.2. Test de l'impulsivité	63
4.4.3. Test de gambling.....	64
partie ii : évaluation d'une stratégie de thérapie génique régulable chez le modele mptp primate non-humain	80
1. Contexte	81
1.1. Généralités sur les thérapies géniques	81
1.2. Les thérapies géniques dans le cadre de la maladie de Parkinson	82
1.2.1. Modulation de l'activité des ganglions de la base par surexpression locale de l'enzyme GAD dans le NST.....	83
1.2.2. Stratégies de neuroprotection des neurones dopaminergiques.....	84
1.2.3. Augmentation du taux de dopamine.....	86
1.3. Évaluation d'une thérapie génique régulable chez le primate non-humain MPTP.....	91
2. Objectifs	94
3. Protocole expérimental	95
4. Matériel et méthodes	95
4.1. Sujets.....	95
4.2. Intoxication au MPTP	96
4.3. Chirurgie.....	96
4.4. Traitement au TMP	96
4.5. Imagerie IRM	97
4.6. Imagerie TEP.....	97
4.7. Évaluation du comportement moteur	98
4.8. Challenge L-DOPA.....	98

4.9.	Évaluation du comportement cognitif	98
4.9.1.	Test de mémoire	98
4.9.2.	Test de mémoire spatiale	99
4.10.	Évaluation du cycle activité/repos	100
4.11.	Analyses post-mortem	100
4.12.	Analyses statistiques	100
5.	Résultats	101
5.1.	Comportement moteur	101
5.2.	Comportement cognitif	103
5.3.	Suivi de la température	106
6.	Discussion	108
PARTIE III : CARACTERISATION D'UN MODELE ALPHA-SYNUCLEINE CHEZ LE PRIMATE NON-HUMAIN.....		112
1.	Contexte	113
1.1.	Les modèles transgéniques	113
1.2.	Les modèles par surexpression virale	113
1.3.	Les modèles par inoculation.....	114
2.	Objectifs	118
3.	Protocole expérimental	118
4.	Matériel et Méthode	119
4.1.	Sujets.....	119
4.2.	Production des fibres d'alpha-synucléine	119
4.3.	Production des extraits de LB	119
4.4.	Chirurgie.....	120
4.5.	Imagerie IRM	120
4.6.	Imagerie TEP.....	120
4.7.	Évaluation du comportement moteur	121
4.8.	Collection des tissus.....	121
4.9.	Analyses histologiques	121
4.10.	Analyses biochimiques	122
4.11.	Analyses statistiques	123
5.	Résultats	123
5.1.	L'impact fonctionnel induit	123
5.2.	La neurotoxicité dopaminergique induite	125
5.3.	La pathologie alpha-synucléine induite.....	127
6.	Discussion	129
Conclusion		134
Bibliographie		135

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Balance entre les facteurs de risque génétiques, environnementaux et comportementaux dans la maladie de Parkinson. D'après (Ascherio & Schwarzschild, 2016).....	16
Figure 2 : Métabolisme de la dopamine. Adapté de (Landry 2009 « Pharmacologie : des cibles vers l'indication thérapeutique »).....	17
Figure 3 : Fonctionnement d'une synapse dopaminergique. D'après (Landry 2009 « Pharmacologie : des cibles vers l'indication thérapeutique »).....	18
Figure 4 : Principales voies dopaminergiques. D'après PHARMACOMédicale.org.....	19
Figure 5 : Interactions entre les noyaux des ganglions de la base. D'après (Recasens et al., 2014).....	20
Figure 6 : Différents territoires fonctionnels des noyaux gris centraux de l'Homme. D'après (Macpherson & Hikida, 2019).....	21
Figure 7 : Modifications des interactions entre les noyaux des ganglions de la base lors de maladie de Parkinson. D'après (DeLong & Wichmann, 2015).....	22
Figure 8 : Séquence de la protéine alpha-synucléine. D'après (Longhena, Faustini, & Bellucci, 2020)....	24
Figure 9 : Processus agrégatif de l'alpha-synucléine. D'après (Dehay et al., 2015).....	25
Figure 10 : Stades de propagation de la pathologie de la maladie de Parkinson selon l'hypothèse de Braak. D'après (Halliday et al., 2011).....	26
Figure 11 : Apparition des symptômes et progression de la maladie de Parkinson. D'après (L. V. Kalia & Lang, 2015).....	28
Figure 12 : Symptômes moteurs typiques du patient parkinsonien. D'après (Murayshid et al., 2020)....	30
Figure 13 : Fluctuations motrices dues au traitement oral de L-DOPA dans le cadre de la maladie de Parkinson.....	34
Figure 14 : DBS au niveau du NST. D'après (DeLong & Wichmann, 2015).....	37
Figure 15 : Différentes stratégies ciblant la progression de la pathologie alpha-synucléine. D'après (Fields, Bengoa-Vergniory, & Wade-Martins, 2019).	40
Figure 16 : Nombre d'études utilisant soit des neurotoxiques, soit des modifications génétiques, soit un mélange des deux pour engendrer un modèle animal de la MP entre 2000 et 2019. D'après (Kin, Yasuhara, Kameda, & Date, 2019).	41
Figure 17 : Pourcentage d'articles utilisant soit le 6-OHDA, soit le MPTP, soit des pesticides soit d'autres toxines pour engendrer un modèle animal de la MP entre 2000 et 2019. D'après (Kin et al., 2019).	42

Figure 18 : Mécanisme d'action du MPTP et ses dérivés pour entrer dans les neurones dopaminergiques. D'après (Przedborski & Jackson-Lewis, 1998).....	49
Figure 19 : Mécanisme d'action du MPP+ dans les neurones dopaminergiques pour induire une mort neuronale. D'après (Przedborski & Jackson-Lewis, 1998).	50
Figure 20 : Exemple d'un marmouset réalisant un ORDT. D'après (Choudhury & Daadi, 2018).....	54
Figure 21 : Différentes étapes du test IEDS. D'après (Decamp & Schneider, 2004).....	55
Figure 22 : Protocole expérimental de l'étude sur la caractérisation des symptômes non-moteurs du modèle MPTP chez le primate non-humain.....	58
Figure 23 : Évaluation de l'activité locomotrice spontanée chez le primate via le logiciel Ethovision® (Noldus).....	61
Figure 24 : Déroulement en plusieurs étapes du test de discrimination visuelle.....	62
Figure 25 : Déroulement en plusieurs étapes du test de l'impulsivité.....	64
Figure 26 : Iowa Gambling Task.....	65
Figure 27 : Déroulement en plusieurs étapes de la 1ère version du test de gambling.	66
Figure 28 : Exemple d'un singe capucin sain effectuant le PGT. D'après (Proctor et al., 2014).	67
Figure 29 : Déroulement en plusieurs étapes de la 2 ^{ème} version du test de gambling.....	67
Figure 30 : Déroulement en plusieurs étapes du test de motivation.....	68
Figure 31 : Dispositif de télémétrie pour suivi de la température corporelle de chez Anipill®.....	69
Figure 32 : Dispositif de télémétrie pour suivi de la température corporelle de chez STAR:ODDI®.....	70
Figure 33 : Analyse du comportement moteur des animaux suite à l'intoxication au MPTP.....	71
Figure 34 : Analyse des performances aux tests cognitifs sur les quatre dernières sessions de travail des animaux suite à l'intoxication au MPTP.....	73
Figure 35 : Analyse des performances au test de gambling de quinze singes sains et de deux singes MPTP sous traitement L-DOPA ou non sur les quatre dernières sessions de travail.....	74
Figure 36 : Analyse du cycle activité/repos via la température corporelle de primates sains (n=4) et de primates MPTP (n=8).....	75
Figure 37 : Analyse du cycle activité/repos via la température corporelle de primates MPTP (n=3).	76
Figure 38 : Rationnel des différentes stratégies de thérapie génique à l'essai dans le cadre de la maladie de Parkinson. D'après (Buttery & Barker, 2020).....	82

Figure 39 : Analyse de TEP 18F-FMT et du comportement moteur des animaux du groupe 1 suite à l'intoxication au MPTP et à l'injection des vecteurs viraux sous différentes dose de traitement TMP (5mg/kg, 10mg/kg et 20mg/kg).....	93
Figure 40 : Niveau d'expression du transgène DD-CH1 au niveau du striatum selon la dose de vecteur viral injectée (1x-27x) et selon l'administration ou non de TMP chez les animaux du groupe 2.....	94
Figure 41 : Protocole expérimental de la deuxième partie de l'étude pilote portant sur l'évaluation d'une thérapie génique régulable chez le primate non-humain MPTP.....	95
Figure 42 : Déroulement en plusieurs étapes d'un essai du test de mémoire.....	99
Figure 43 : Déroulement en plusieurs étapes d'un essai du test de mémoire spatiale.....	100
Figure 44 : Analyse du comportement moteur des animaux suite à l'intoxication au MPTP et l'injection des vecteurs viraux.....	102
Figure 45 : Analyse de la réponse à la L-DOPA (administration orale de 30mg/kg de L-DOPA) durant des vidéos de six heures suite à l'intoxication au MPTP et à l'injection des vecteurs viraux.....	103
Figure 46 : Analyse du comportement cognitif sur les quatre dernières sessions des animaux au stade stablement parkinsonien et suite à l'injection des vecteurs viraux.....	104
Figure 47 : Analyse des réponses au test de gambling sur les quatre dernières sessions des animaux au stade stablement parkinsonien et suite l'injection des vecteurs viraux.....	105
Figure 48 : Analyse du comportement cognitif sur les quatre dernières sessions des animaux suite à l'injection des vecteurs viraux.....	106
Figure 49 : Analyse du cycle activité/repos via la température corporelle des animaux suite à l'injection des vecteurs viraux.....	107
Figure 50 : Structures amyloïdes de deux souches d'alpha-synucléine. D'après (Melki 2015).....	117
Figure 51 : Protocole expérimentale de l'étude pilote sur la caractérisation d'un modèle alpha-synucléine chez le primate non-humain.....	119
Figure 52 : Suivi in vivo par imagerie TEP 18F-FDG après injection de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNH.....	124
Figure 53 : Suivi in vivo de la locomotion spontanée à 6, 9, 12 et 18 mois post-injection (moPI) de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNHs adultes.....	125
Figure 54 : Changements dans l'activité et l'expression de l'enzyme AADC induits par l'injection de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNH.....	126
Figure 55 : Modifications de l'expression de la TH induites par l'injection de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNH 18 mois post injection.....	127

Figure 56 : Pathologie alpha-synucléine dans plusieurs régions cérébrales (cortex cingulaire, le noyau caudé, le putamen, le globus pallidus, le cortex entorhinal, l'amygdale, la substance noire induite par l'injection de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNH 18 mois post injection.	128
Figure 57 : Pathologie alpha-synucléine dans plusieurs régions cérébrales (cortex cingulaire, le noyau caudé, le putamen, le globus pallidus, le cortex entorhinal, l'amygdale, la substance noire) induite par l'injection de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNHs à 18 mois post-injection.	129
Figure 58 : Protocole expérimentale de l'étude sur la caractérisation d'un modèle alpha-synucléine chez le primate non-humain.	133

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des gènes les plus communément impliqués dans la maladie de Parkinson. Adapté de (Blauwendraat et al., 2020; Corti, Lesage, & Brice, 2011).....	14
Tableau 2 : Principales caractéristiques des différentes synucléinopathies. Adapté de (McCann, Stevens, Cartwright, & Halliday, 2014).....	24
Tableau 3 : Résumé des données de la phase d'intoxication au MPTP par PNH de l'étude sur la caractérisation des symptômes non-moteurs du modèle MPTP chez le primate non-humain.....	59
Tableau 4 : Échelle de score clinique adaptée de (Papa & Chase, 1996).	60
Tableau 5 : Principales caractéristiques des principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique en neurosciences.	81
Tableau 6 : Principaux résultats des essais cliniques ayant utilisé la surexpression virale de l'enzyme GAD au niveau du NST dans le cadre de la maladie de Parkinson.....	83
Tableau 7 : Principaux résultats des essais cliniques ayant utilisé la surexpression virale du facteur neurotrophique GDNF au niveau du putamen dans le cadre de la maladie de Parkinson.	84
Tableau 8 : Principaux résultats des essais cliniques ayant utilisé la surexpression virale du facteur neurotrophique neurturine au niveau du putamen et/ou de la SN dans le cadre de la maladie de Parkinson.....	85
Tableau 9 : Principaux résultats des essais cliniques ayant utilisé la surexpression virale de l'enzyme AADC au niveau du putamen dans le cadre de la maladie de Parkinson.	87
Tableau 10 : Principaux résultats des essais cliniques ayant utilisé la surexpression virale des enzymes AADC, TH et CH1 au niveau du putamen dans le cadre de la maladie de Parkinson.....	89
Tableau 11 : Groupes d'injection de la première partie de l'étude pilote sur l'évaluation d'une thérapie génique régulable chez le primate MPTP.	92
Tableau 12 : Groupes d'injection de la deuxième partie de l'étude pilote portant sur l'évaluation d'une thérapie génique régulable chez le primate non-humain MPTP.....	96
Tableau 13 : Paramètres d'injection de l'étude sur la caractérisation d'un modèle alpha-synucléine chez le primate non-humain.	120
Tableau 14 : Groupes d'injection de l'étude sur la caractérisation d'un modèle alpha-synucléine chez le primate non-humain.	132

TABLE DES ABREVIATIONS

3MT	3-méthoxytyramine
6-OHDA	6-hydroxydopamine
α -syn	Alpha-synucléine
AADC	Aromatic L-amino acid decarboxylase
AAV	Adeno associated virus
BH4	5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin
BHE	Barrière hémato encéphalique
Cd	Noyau caudé
COMT	Catéchol-O-méthyl transférase
CSST	Conceptual set shifting task
DA	Dopamine
DAT	Dopamine agonist transporter
DBS	Deep brain stimulation
DD	Déhydrofolate réductase déstabilisée
LBD	Lewy body dementia
DOPAC	Acide dihydroxyphénylacétique
FIB	Fibrilles
GCH1	GTP cyclohydrolase I
GDNF	Glial cell line derived neurotrophic factor
GPe	Globus pallidus externe
GPI	Globus pallidus interne
HVA	Acide homovanillique
IEDS	Intra-Extra dimensional set shift task
IGT	Iowa gambling task
IM	Intramusculaire
IV	Intraveineux
LB	Lewy Body
LID	L-DOPA induced dyskinesia
LN	Lewy neurites
LV	Lentivirus
L-DOPA	L-amino-acide tyrosine en L-3,4 dihydroxyphénylalanine
MAO	Monoamine-oxydase
MP	Maladie de Parkinson
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
NMS	Non-motor symptoms
MSA	Multiple system atrophy
NST	Noyau subthalamique
ORDT	Object retrieval detour task
PGT	Primate gambling task
Put	Putamen
RIB	Rubbans
SNpc	Substance noire pars compacta
SNpr	Substance noire pars reticulata
TEP	Tomographie par émission de positons
TDM	Total distance moved
TH	Tyrosine hydroxylase
TMP	Triméthoprime
UPDRS	Unified Parkinson's disease rating scale
VDR	Variable delay response

VMAT-2	Vesicular monoamine transporter 2
VTA	Ventral tegmental area
WCST	Wisconsin card sorting test
WT	Wild type

INTRODUCTION

1. Généralités sur la maladie de Parkinson :

Histoire, épidémiologie et étiologie

1.1. Histoire de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) a été observée et partiellement décrite dès 1000 ans avant JC dans le système médical ayurvédique indien. Elle était appelée « Kampavata », Kampa voulant dire tremblement en sanskrit. Les indiens utilisaient alors les graines broyées de la plante tropicale pois mascate (*mucuna pruriens*) pour traiter cette maladie. Depuis, il a été démontré que cette plante contient entre 4 et 6% de L-DOPA qui n'est autre que le précurseur de la dopamine utilisée de nos jours comme traitement symptomatique (Ovallath & Deepa, 2013).

Ce n'est que bien plus tard, en 1817, que la maladie de Parkinson fut cliniquement décrite par le médecin londonien James Parkinson. Après avoir observé six patients lors de leurs promenades, il publie une description médicale précise de cette maladie dans son essai "An essay on the shaking palsy". Il y décrit les principaux symptômes de ce qu'il appelle la paralysie agitante, à savoir le tremblement, l'instabilité posturale, l'akinésie ou encore la rigidité musculaire (Parkinson, 2002).

Cinquante ans plus tard, Jean-Martin Charcot, un neurochirurgien français, établit une description plus détaillée de la maladie. Il fait la différence entre la rigidité et la bradykinésie, qu'il ajoute à la liste des principaux symptômes. Il précise que le tremblement est un tremblement de repos uniquement et fait alors la différence entre plusieurs types de maladies à tremblement (*Charcot, Œuvres complètes - Leçons sur les maladies du système nerveux, 1872*). Il renomme cette maladie « Maladie de Parkinson » en hommage au travail de James Parkinson.

La compréhension de la physiopathologie de la MP commença avec le médecin français Edouard Brissaud en 1895. Il découvre que la pathologie a pour épicode une région du cerveau appelée la substance noire. Ceci sera confirmé en 1919 par l'analyse post-mortem de cerveaux de patients atteints de la MP par Konstantin Tretiakoff (Goetz, 2011). Dans les années 50, Arvid Carlsson caractérise la dopamine (DA) comme neurotransmetteur et identifie sa déplétion dans la MP (A. Carlsson & Waldeck, 1958). Puis, en 1961, l'équipe d'Adams identifie la dégénérescence de la voie nigrostriée comme une caractéristique anatomopathologique de la MP (Adams, Van Bogaert, & Van Der Eecken, 1961).

En 1912, le neurologue Fritz Jacob Heinrich Lewis décrit pour la première fois des inclusions compactes sphériques dans les neurones du noyau dorsal du nerf vague et de la substance noire (Lewy, *Pathologische anatomie Handbuch der neurologie, 1912*). Ce n'est que 7 ans plus tard, lorsque Konstantin Tretiakoff observera également ces inclusions dans diverses régions de cerveaux de patients parkinsoniens, qu'elles seront nommées corps de Lewy (Tretiakoff, *Theses de Paris, 1919*). Dans les années 90, Maria Spillantini observe que le composant majeur de ces corps de Lewy est la protéine alpha-synucléine (Spillantini et al., 1997).

En 1953, Greenfield et Bosanquet ont décrit pour la première fois la progression clinique de la MP en différents stades. Ils observent que la pathologie est d'abord unilatérale (stade I), puis devient bilatérale (stades II-V), et enfin que l'instabilité posturale se développe (stade III) (Greenfield & Bosanquet, 1953). Ceci est une stratification par la symptomatologie mais il existe également une stratification par la progression de la pathologie alpha-synucléine décrite par Braak et qui sera évoquée plus tard (Introduction 2.2.2).

1.2. Épidémiologie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer et est le trouble du mouvement le plus commun.

La prévalence de la MP est de une à deux personnes pour 1000 (Tysnes & Storstein, 2017), ce qui représenterait en 2020 9,4 millions de personnes dans le monde et 157 000 personnes en France (N.Maserejian, Estimation of the 2020 global of Parkinson's disease abstract Mov Disord 2020). Elle ne fait qu'augmenter au fil des années. Par exemple, il a été estimé que le nombre de patients parkinsoniens à travers le monde allait quasiment doubler entre les années 2015 et 2050 (Rocca, 2018).

Le premier facteur explicatif de cette augmentation du nombre de cas est le vieillissement général de la population. La prévalence de la maladie est de 1% chez les personnes de plus de 60 ans et atteint 4-5% chez les personnes de plus de 70 ans (Zafar & Yaddanapudi, 2021). Le deuxième facteur est l'amélioration des outils de diagnostic qui permettent de diagnostiquer plus de patients qu'auparavant.

1.3. Étiologie de la maladie de Parkinson

L'étiologie de la maladie de Parkinson reste inconnue de nos jours. L'initiation de la maladie serait due à une combinaison de facteurs qui peuvent être individuels, génétiques, environnementaux ou encore comportementaux.

Il est estimé que dans 5 à 10% des cas, la cause de la maladie aurait une origine génétique et que au moins dans certaines formes génétiques on parle uniquement d'un facteur de risque. Ces formes génétiques, aussi appelées formes familiales, débutent plus précocement, souvent avant l'âge de 40 ans (Tysnes & Storstein, 2017). Pour les autres cas on parle de formes sporadiques/idiopathiques. L'âge moyen du début des symptômes de la maladie est de 65-70 ans (Tysnes & Storstein, 2017).

Les premières études étiologiques de la MP commencèrent avec William Growers dans les années 1880. Il étudia un groupe de 80 patients et détermina que l'initiation de la maladie survenait vers 60 ans, qu'il y avait des formes héréditaires avec un début plus précoce, mais surtout, que les hommes étaient plus souvent touchés que les femmes (*Pearce, Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 1989*). En effet, le rôle protecteur des estrogènes sur le système dopaminergique pourrait expliquer en partie le fait que les hommes sont plus touchés que les femmes avec un ratio estimé à 2 pour 1 (Van Den Eeden et al., 2003). Cette différence pourrait également être expliquée par une différence d'exposition aux facteurs de risque de la maladie.

1.3.1. Les facteurs génétiques

Lorsque la maladie est associée à une atteinte génétique, cela peut être dû à des mutations sur un, ou plusieurs gènes. On parle de formes monogéniques ou multigéniques. Les mutations peuvent avoir lieu au niveau de gènes dominants ou récessifs. Ces mutations peuvent être très pénétrantes et causer la MP ou bien être seulement un facteur de risque de développer la maladie (Blauwendraat, Nalls, & Singleton, 2020).

Suite à la découverte de la première mutation génétique en 1997 (Polymeropoulos et al., 1997), plus de 30 mutations ont été répertoriées sur le gène *SNCA* comme impliqués dans la MP. Le gène *SNCA*, à transmission autosomique dominante, code pour la protéine alpha-synucléine (α -syn). Ces diverses mutations engendrent une mauvaise conformation de l' α -syn et son agrégation, ce qui est une caractéristique physiopathologique de la maladie de Parkinson. En plus des substitutions, il peut également y avoir des phénomènes de duplication ou triplication du gène. Cela engendre des copies supplémentaires du gène et un excès d' α -syn. Dans ce cas, il y a un effet dose du gène sur la sévérité et l'âge d'initiation de la maladie (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibáñez et al., 2004).

Par la suite, d'autres études ont pu mettre en évidence d'autres gènes impliqués dans la maladie de Parkinson dont les plus fréquents sont répertoriés dans le **tableau 1**. Pour le moment, plus d'une vingtaine de gènes ont été identifiés comme étant associés à la maladie de Parkinson (Blauwendraat et al., 2020). De plus, 900 mutations ont été identifiées comme étant des facteurs de risque dont les plus fréquentes impliquent le gène *GBA* codant pour l'enzyme lysosomale β -glucocerebrosidase (chez 5 à 10% des patients), le gène *UCHL1* qui participe à la production de l'ubiquitine et le gène *PARKIN* (Sidransky & Lopez, 2012).

Tableau 1 : Principales caractéristiques des gènes les plus communément impliqués dans la maladie de Parkinson. Adapté de (Blauwendraat et al., 2020; Corti, Lesage, & Brice, 2011).

Gène (Protéine)	Principales fonctions	Mutations	Mode de transmission	% de cas	Apparition de la maladie
<i>SNCA</i> (Alpha-synucléine)	Trafic membranaire Trafic vésiculaire Plasticité neuronale	A53T, A30P, E46K, H50Q, G51D Duplication/triplication	Autosomique dominant	<1% des formes familiales	Précoce ou tardive selon la mutation
<i>LRKK2</i> (LRKK2)	Trafic membranaire Activité autophagique Activité lysosomale	Plus de 80 mutations (dont G2019S)	Autosomique dominant	1 à 5% des formes familiales	Tardive
<i>PARK2</i> (Parkin)	Activité mitophagique Système ubiquitine-protéasome	Plus de 200 mutations	Autosomique récessif	50% des cas précoces 15% des cas sporadiques	Précoce
<i>PINK1</i> (PINK1)	Activité mitophagique	Plus de 50 mutations	Autosomique récessif	1 à 8% des cas précoces	Précoce
<i>PARK7</i> (DJ-1)	Activité mitochondriale Défense antioxydante	Plus de 15 mutations, délétions	Autosomique récessif	1 à 2% des cas précoces	Précoce

La recherche de mutations s'est accélérée grâce à des avancées technologiques et bioinformatiques qui permettent des études d'association pangénomique. Ces études génétiques permettent de mieux comprendre la physiopathologie de la MP, d'identifier de nouvelles pistes pour générer des modèles animaux de la maladie mais aussi et surtout d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (Sardi & Simuni, 2019).

La MP ne peut pas être expliquée par la génétique de manière complète. Il faut également l'intervention de facteurs individuels, environnementaux et comportementaux.

1.3.2. Les autres facteurs de risque

Parmi les facteurs environnementaux on retrouve l'exposition à des toxiques tels que des métaux lourds, des pesticides, des insecticides ou encore des herbicides (Ascherio et al., 2006; J. S. Mandel, Adami, & Cole, 2012; Manning-Bog et al., 2002; McCormack et al., 2002).

Certains facteurs comportementaux ont aussi été associés à la MP tels que la prise de drogues comme la méthamphétamine (Callaghan, Cunningham, Sajeev, & Kish, 2010), la consommation de produits laitiers (H. Chen et al., 2007), les traumatismes crâniens (Marras et al., 2014) ou encore les cancers (R. Liu, Gao, Lu, & Chen, 2011).

Au contraire, certains facteurs semblent inversement associés à la MP et pourraient avoir un rôle protecteur comme la consommation de tabac (Thacker et al., 2007), de café (Palacios et al., 2012), d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Bornebroek et al., 2007), de bloqueurs de canaux calciques (Pasternak et al., 2012) ou encore d'alcool (D. Zhang, Jiang, & Xie, 2014).

La maladie de Parkinson semble donc être est une maladie multifactorielle dont le rôle et l'impact de chaque facteur est encore difficile à déterminer (**Figure 1**). Il faut acquérir une meilleure compréhension des facteurs de risque et de leurs interactions pour pouvoir mieux comprendre la physiopathologie de la maladie, identifier de nouveaux biomarqueurs ou encore trouver des traitements individualisés.

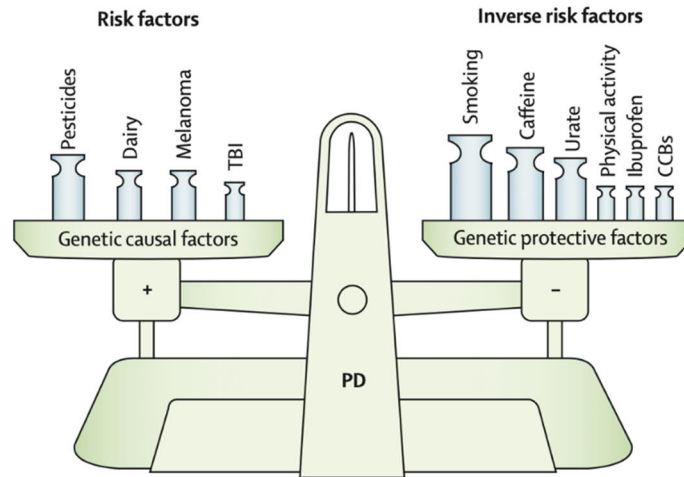


Figure 1 : Balance entre les facteurs de risque génétiques, environnementaux et comportementaux dans la maladie de Parkinson. D'après (Ascherio & Schwarzschild, 2016).
TBI = traumatic brain injury, CCBs = calcium channel blockers.

2. Physiopathologie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est caractérisée par deux principaux phénomènes physiopathologiques :

- 1) **La perte de dopamine** engendrée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire et leurs innervations dans le striatum ;
- 2) **L'agrégation de la protéine alpha-synucléine** au sein d'inclusions intracytoplasmiques.

2.1. La dopamine, la voie dopaminergique nigrostriée, et les ganglions de la base

2.1.1. La dopamine

La dopamine est un neuromodulateur/neurotransmetteur, découvert par Arvid Carlsson en 1958, dont la fonction est de réguler certaines populations de neurones (Benes, 2001). La dopamine joue un rôle essentiel dans les fonctions motrices, dans certaines fonctions cognitives mais aussi dans de nombreux processus comportementaux comme l'humeur, le système de récompense, la motivation ou encore l'addiction.

Tout comme l'adrénaline et la noradrénaline, la dopamine fait partie de la famille des catécholamines dont le point commun est d'être synthétisée à partir de l'acide aminé tyrosine. En effet la dopamine est synthétisée dans les neurones dopaminergiques via deux réactions chimiques principales (**Figure 2**).

- La première étape est la transformation de l'acide aminé tyrosine en L-3,4 dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH). L'activité de l'enzyme

TH nécessitant la présence du co-facteur 5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH4), lui-même synthétisé par l'enzyme GTP cyclohydrolase I (GCH1). Cette réaction est l'étape limitante de la production de dopamine.

- La deuxième réaction est la décarboxylation de la L-DOPA en dopamine par l'enzyme amino-acide décarboxylase (AADC).

Une fois produite, la dopamine va être chargée dans les vésicules synaptiques par l'action du transporteur vésiculaire VMT2 puis libérée au niveau de la membrane présynaptique lors de l'arrivée d'un potentiel d'action. Une fois dans la fente synaptique, la dopamine va se fixer sur des récepteurs dopaminergiques, localisés au niveau de la membrane post synaptique (**Figure 3**). La plus grosse partie de la dopamine sera ensuite recapturée par les neurones dopaminergiques via le transporteur membranaire DAT et dégradée par des enzymes mitochondriales monoamine-oxydase (MAO) en acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC). La dopamine extracellulaire restante sera à terme dégradée par la catéchol-O-méthyl transférase (COMT) en 3-méthoxytyramine (3MT). Le 3MT et la DOPAC peuvent ensuite être à leur tour dégradés en acide homovanillique (HVA) (**Figure 2**).

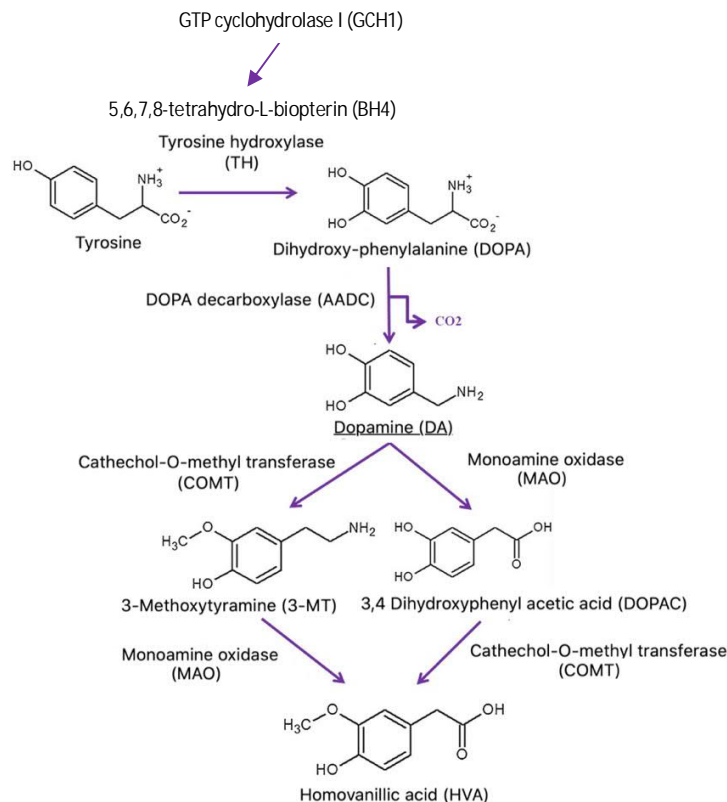


Figure 2 : Métabolisme de la dopamine. Adapté de (Landry 2009 « Pharmacologie : des cibles vers l'indication thérapeutique »).

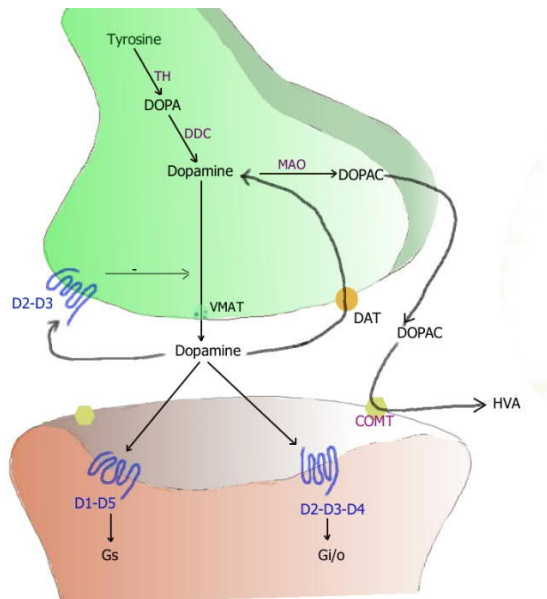


Figure 3 : Fonctionnement d'une synapse dopaminergique. D'après (Landry 2009 « Pharmacologie : des cibles vers l'indication thérapeutique »).

Les récepteurs dopaminergiques sont des récepteurs couplés aux protéines G. Il en existe cinq types que l'on peut classer en deux familles :

- La famille des récepteurs D1 : RD1 et RD5 couplés à la protéine Gs ce qui va aboutir à une augmentation de l'excitabilité de la cellule.
- La famille des récepteurs D2 : RD2, RD3 et RD4 couplés à la protéine Gi ce qui va aboutir à une réduction de l'excitabilité de la cellule.

On retrouve la présence de ces récepteurs dopaminergiques dans le système nerveux central mais aussi au sein du système nerveux périphérique présent dans nombreux tissus (tractus digestif, artères, rein, cœur).

Si moins d'1% des neurones du cerveau sont capables de produire de la dopamine (Chinta & Andersen, 2005), 90% de ces neurones se trouvent au niveau de deux régions du mésencéphale : la **substance noire pars compacta** (SNpc) et l'**aire tegmentale ventrale** (VTA). Les projections de ces neurones dopaminergiques constituent les trois principales voies dopaminergiques connues (**Figure 4**) :

- La **voie nigrostriée** dont les neurones situés dans la SNpc projettent leurs axones au niveau du striatum.
- La **voie méso-limbique** dont les neurones localisés au sein de la VTA, innervent le système limbique (noyau accumbens, amygdale, hippocampe).

Enfin, la **voie méso-corticale** dont les neurones de la VTA projettent dans le cortex frontal (cortex cingulaire, cortex entorhinal).

En plus de ces trois voies principales il y a aussi quelques neurones dopaminergiques présents au sein de l'hypothalamus dont les neurones projettent au niveau de l'hypophyse (voie tubéro-infundibulaire).

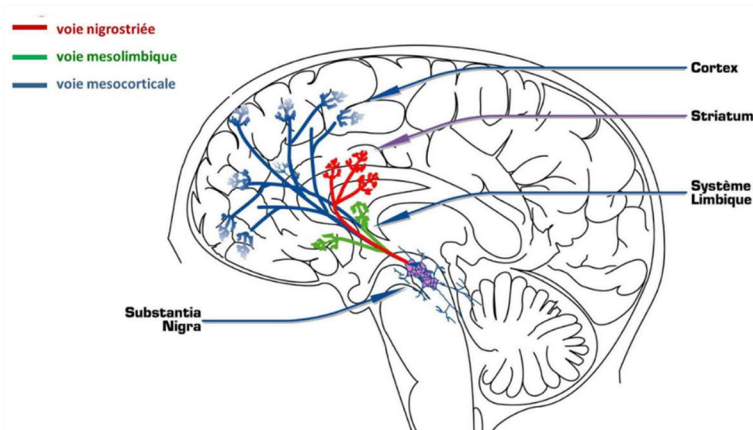


Figure 4 : Principales voies dopaminergiques. D'après PHARMACOMédicale.org.

La dopamine produite au niveau du striatum va jouer son rôle de modulateur et influencer tout le fonctionnement des ganglions de la base.

2.1.2. Les ganglions de la base

Le terme de « ganglions de la base » ou de noyaux gris centraux décrit un ensemble de structures sous-corticales dont le rôle est d'intégrer l'information provenant de différentes structures corticales (frontal, pariétal, temporal et limbique), de traiter ces informations dans différentes structures relais sous corticales, et de les redistribuer ensuite à différentes aires corticales.

Les ganglions de la base sont ainsi constitués de quatre noyaux interconnectés (**Figure 5**) :

- Le **striatum** qui est lui-même composé du **noyau caudé** (Cd) et du **putamen** (Put). Il s'agit de la structure d'entrée des informations corticales. En plus des afférences glutamatergiques excitatrices du cortex, le striatum reçoit aussi des afférences glutamatergiques excitatrices du thalamus et modulatrices dopaminergiques en provenance de la substance noire pars compacta. Les neurones striataux sont majoritairement GABAergiques inhibiteurs et projettent au niveau du segment externe du globus pallidus (GPe) ou du complexe de sortie formé par la substance noire pars reticulata (SNpr) et le segment interne du Globus pallidus (GPi).
- Le **pallidum** (GP) qui est lui-même composé de son segment interne (GPi) et de son segment externe (GPe). Les neurones du GP sont majoritairement GABAergiques inhibiteurs. Les neurones du GPe projettent sur le NST alors que ceux du GPi projettent sur le noyau ventral antérieur et le noyau ventrolatéral du thalamus (VA/VL).
- Le **noyau sous-thalamique** (NST) dont les neurones sont majoritairement glutamatergiques excitateurs et projettent sur le complexe de sortie SNpr/GPi.
- La **substance noire** (SN) qui est subdivisée en **substance noire pars reticulata** (SNpr) et **substance noire pars compacta** (SNpc). Les neurones de la SNpr sont majoritairement GABAergiques inhibiteurs et projettent sur le thalamus, alors que ceux de la SNpc sont dopaminergiques et

projetent au niveau du striatum (voie nigrostriée). En tout, seuls 3 à 5% des neurones de la SN sont de type dopaminergique (Chinta & Andersen, 2005).

Le thalamus (VA/VL) ne fait pas partie à proprement parlé des ganglions de la base mais reçoit de ceux-ci d'importantes afférences inhibitrices. Ses neurones glutaminergiques excitateurs projettent à leur tour au niveau de différentes aires corticales. Ils constituent la principale voie de sortie des noyaux gris centraux.

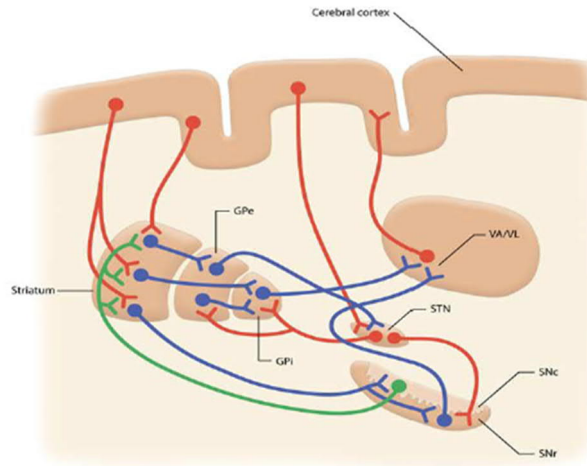


Figure 5 : Interactions entre les noyaux des ganglions de la base. D'après (Recasens et al., 2014).

GPI = Globus pallidus intern, GPe = Globus Pallidus extern, SNr = Substantia nigra reticulata, SNc = Substantia nigra compacta, STN = sub-thalamic nucleus, VL = Ventral lateral, VA = Ventral anterior. Bleu = GABA (inhibiteur), Rouge = Glutamate (excitateur) et Vert = Dopamine (modulation).

Les ganglions de la base reçoivent des informations de différentes aires corticales. Il existe donc plusieurs boucles fonctionnelles parallèles : motrices, cognitives et limbiques (Alexander, DeLong, & Strick, 1986) (Figure 6), ce qui en fait une structure intégratrice essentielle. Le striatum peut ainsi être divisé en trois territoires fonctionnels. D'abord le territoire sensori-moteur localisé au niveau du putamen dorsal et dont les afférences proviennent des cortex moteur et sensitif. Ensuite, le territoire associatif qui implique le noyau caudé et dont les principales afférences proviennent du cortex préfrontal. Enfin, le territoire limbique qui se trouve au niveau du noyau accumbens (partie antérieure et ventrale du striatum) et dont les afférences proviennent des cortex cingulaire, orbito-frontal, de l'hippocampe et de l'amygdale. La délimitation anatomique entre ces trois territoires fonctionnels n'est pas parfaitement définie et certaines parties peuvent se recouper.

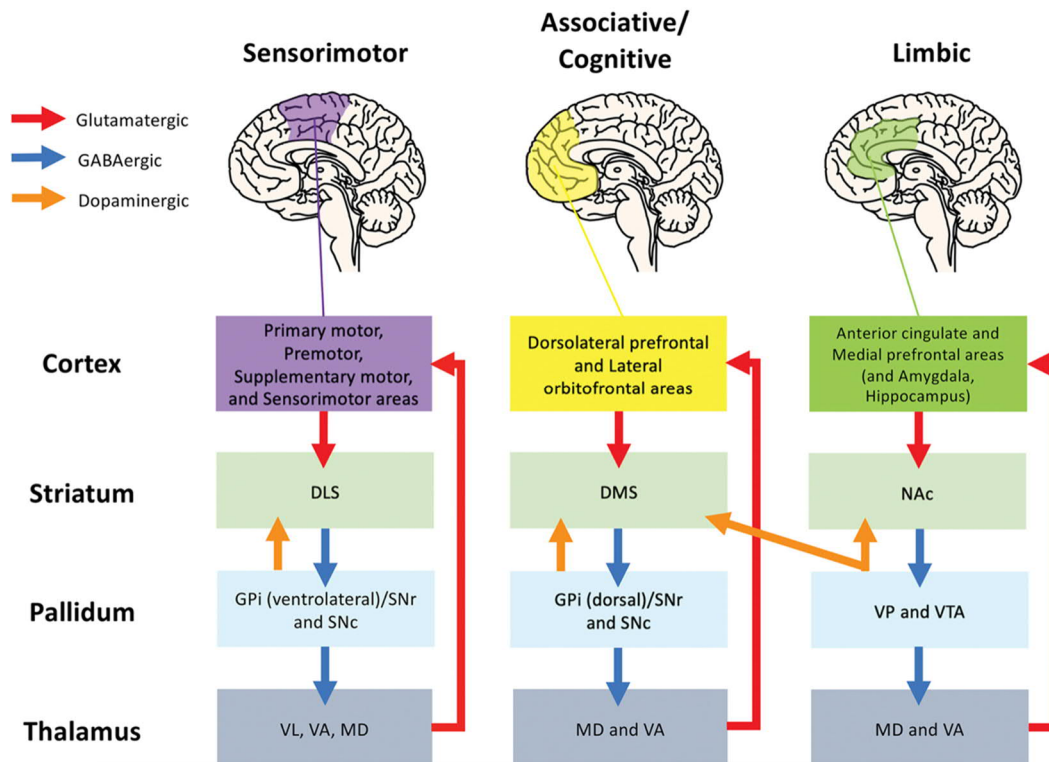


Figure 6 : Différents territoires fonctionnels des noyaux gris centraux de l'Homme.
D'après (Macpherson & Hikida, 2019).

Violet = circuit sensori-moteur, Jaune = circuit associatif et Vert = circuit limbique. Les flèches rouges représentent des afférentations glutamatergiques, les flèches bleues des afférentations GABAergiques et les flèches orange des afférentations dopaminergiques. DLS = Dorso lateral striatum, DMS = Dorso medial striatum, Nac = Nucleus accumbens, GPi = Globus pallidus intern, SNr = Substantia nigra reticulata, SNc = Substantia nigra compacta, VP = ventral pallidum, VTA = ventral tegmental area, VL = Ventral lateral, VA = Ventral anterior, MD = Medio dorsal.

Il existe deux voies d'interconnexion entre la structure d'entrée (le striatum) et la structure de sortie (SNr/GPi) des ganglions de la base :

- La **voie directe** : qui projette directement vers les structures de sortie que constitue le complexe GPi/SNr.
- La **voie indirecte** : qui projette également vers le GPi et la SNr mais en transitant par deux noyaux (GPe et NST).

En fonction des neurotransmetteurs (inhibiteurs et excitateurs) mis en jeu, ces deux voies auront des effets opposés sur le complexe SNr/GPi, la voie directe l'inhibant via sa composante GABAergique, la voie indirecte l'activant via la composante excitatrice glutamatergique du NST. Le jeu de ces deux voies résulte en un équilibre entre inhibition et excitation du complexe SNr/GPi, lui-même inhibiteur des noyaux VA et VL thalamiques exerçant un effet excitateur glutamatergique sur les aires corticales de sortie.

A noter, qu'une voie dite hyperdirecte a été décrite par laquelle des informations corticales transitent directement vers le NST.

Comme évoqué précédemment, la dopamine, produite par les neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée, joue un rôle de modulateur au niveau du striatum. En effet, la stimulation des récepteurs D1 par la dopamine active la voie directe ; celle des récepteurs D2 inhibe la voie indirecte. En résumé, l'action de la dopamine exerce donc un effet facilitateur sur l'activité corticale, notamment sur le cortex moteur (aire motrice supplémentaire, AMS).

2.1.3. Les ganglions de la base dans la maladie de Parkinson

Lors de la MP, la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la SNpc et de la VTA aboutit à une baisse drastique du taux de dopamine dans le striatum. La dopamine ne jouant plus son rôle de neuromodulateur de la voie directe et de la voie indirecte, il en résulte une inhibition excessive des noyaux thalamiques et une inactivation des aires corticales, notamment du cortex moteur à l'origine du mouvement (**Figure 7**). Cette atteinte explique ainsi une partie des symptômes moteurs et non-moteurs de la maladie.

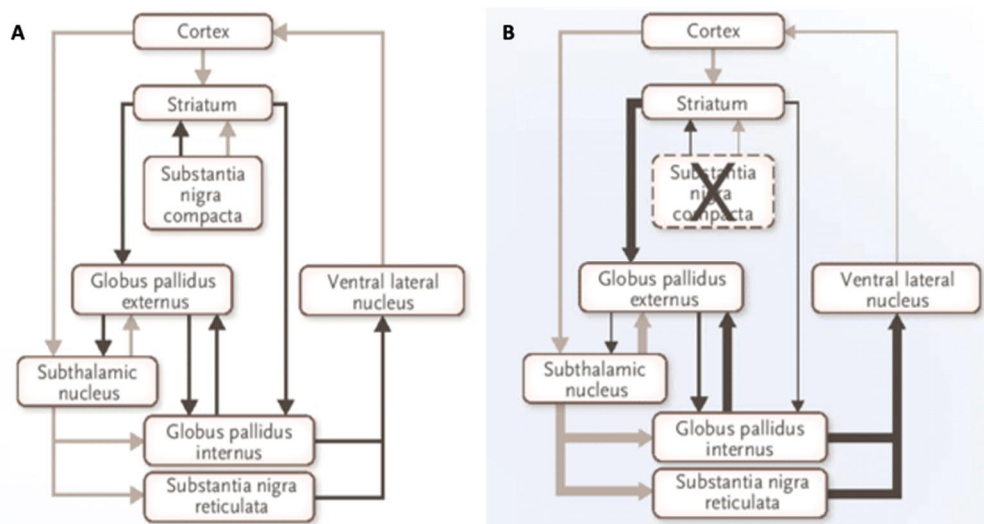


Figure 7 : Modifications des interactions entre les noyaux des ganglions de la base lors de maladie de Parkinson. D'après (DeLong & Wichmann, 2015).

Interactions des noyaux des ganglions de la base **A**) en condition physiologie et **B**) et lors de maladie de Parkinson. Les flèches noires indiquent des inhibitions et les flèches grises des excitations. Les flèches plus épaisses indiquent une augmentation d'activité et les flèches moins épaisses une diminution d'activité.

Il est important de noter que la déplétion en dopamine ne se fait pas de façon uniforme dans le striatum. Dans un premier temps, celle-ci est plus forte au niveau du striatum dorsal qui est principalement innervé par la SNpc. Le striatum ventral (noyau accumbens) est lui plus tardivement atteint car il est principalement innervé par la VTA, relativement épargnée par le processus neurodégénératif par rapport à la SNpc (Nyberg et al., 1985). Cette différence de vulnérabilité pourrait être expliquée par un ratio différent entre DAT et VMAT2 sur les afférences terminales des neurones dopaminergiques de la SNpc (González-Hernández, Barroso-Chinea, De La Cruz Muros, Del Mar Pérez-Delgado, & Rodríguez, 2004; Miller, Gainetdinov, Levey, & Caron, 1999). Cela pourrait également être dû à des différences dans la variété de neurones qu'elles contiennent, leur niveau d'expression de canaux calciques ou encore leur

niveau d'expression d'alpha-synucléine (Alberico, Cassell, & Narayanan, 2015). Les neurones dopaminergiques seraient plus touchés du fait de leur plus grande sensibilité au stress oxydatif à cause de leur fort métabolisme en oxygène, de leur faible niveau en antioxydants et de leur teneur élevée en fer. On parle alors de **gradient striatal dorso-ventral de déafférentation dopaminergique**.

En parallèle, le striatum dorsal lui-même n'est pas atteint uniformément, la déplétion dopaminergique étant plus forte au niveau postérieur. Ceci est dû au fait que dans la SNpc, le tiers le plus ventral, qui projette vers la partie postérieure du putamen, est le plus atteint (Gibb, Johnson, & Hanson, 1990). On décrit alors un **gradient striatal caudo-rostral de déafférentation dopaminergique**. Ces observations résultent à la fois d'analyses histologiques et biochimiques post-mortem mais aussi des études in vivo par tomographie par émission de positons (TEP) (Stoessl, 2012; Stoessl, Martin, McKeown, & Sossi, 2011).

L'atteinte striatale suit donc un double gradient. En résumé, le putamen post-commissural sensori-moteur est la région la plus précocement et fortement atteinte (moins de 1% de dopamine restante), alors que le noyau caudé associatif est à la fois moins touché et affecté plus tardivement (4% de dopamine restante pour la portion la plus rostrale dorsale et 40% pour le reste) (Kish, Shannak, & Hornykiewicz, 1988). Ceci explique la prédominance des symptômes moteurs dans la MP, au stade initial.

En plus du système dopaminergique, les systèmes cholinergique, noradrénergique et sérotoninergique sont aussi affectés mais dans une moindre mesure (Cash et al., 1987; Kish, 2003; Kish et al., 2008; Zarow, Lyness, Mortimer, & Chui, 2003). Ces atteintes non dopaminergiques jouent par ailleurs un rôle essentiel dans le développement de symptômes non moteurs, telle que la dépression pour le système sérotoninergique (G. M. Halliday, Blumbergs, Cotton, Blessing, & Geffen, 1990; Politis & Niccolini, 2015).

2.2. La pathologie liée à alpha-synucléine

2.2.1. L'alpha-synucléine

L'alpha-synucléine est une petite protéine pré-synaptique de 140 acides aminés de la famille des synucléines. Elle fut découverte en 1988 dans l'organe électrique de raie (Maroteaux, Campanelli, & Scheller, 1988) puis quelques années plus tard chez l'être humain (Jakes, Spillantini, & Goedert, 1994). A l'époque, on pensait qu'elle était présente à la fois au niveau de la membrane présynaptique et du noyau cellulaire, d'où son nom synucléine, contraction de synapse et nucleus. Depuis, la localisation nucléaire a été invalidée mais le nom est resté (Iwai et al., 1995).

L' α -syn est exprimée constitutivement dans l'organisme. On la retrouve en grande quantité dans le cerveau mais aussi au niveau du cœur, des muscles ou encore des hématies du sang. Il n'y a qu'une exception pour le foie qui en est dépourvu (Jakes et al., 1994).

L' α -syn est divisée en trois domaines fonctionnels (**Figure 8**) :

- Le domaine N-terminal (1-60 aa) qui permet la liaison aux lipides des membranes via ces hélices α . Il contient les mutations A30P, E46K et A53T.
- Le domaine central (61-95 aa) qui permet l'agrégation de la protéine via ces feuillets β .

- Le domaine C-terminal (96-140 aa) qui permet sa phosphorylation au niveau de la sérine 129.

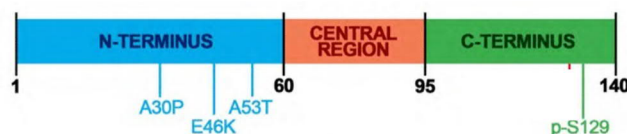


Figure 8 : Séquence de la protéine alpha-synucléine. D'après (Longhena, Faustini, & Bellucci, 2020).

Ses nombreuses fonctions ne sont toujours pas complètement comprises. Cependant on sait que l'alpha-synucléine joue un rôle, entre autres, dans :

- Le trafic des vésicules présynaptiques, notamment en interagissant avec le complexe SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) et avec les lipides membranaires (Burré et al., 2010; H. J. Lee, Kang, Lee, & Im, 2011). Cela lui permettrait d'amincir et de courber les membranes (Varkey et al., 2010).
- La différenciation et la plasticité neuronale (Clayton & George, 1998).
- Le développement et la maturation des oligodendrocytes (Djelloul et al., 2015).
- La régulation du métabolisme de la dopamine en interagissant avec l'enzyme TH (X. Peng, Tehrani, Dietrich, Stefanis, & Perez, 2005; R. G. Perez et al., 2002), l'enzyme AADC (Tehrani, Montoya, Van Laar, Hastings, & Perez, 2006), le transporteur DAT (Butler et al., 2015; F. J. Lee, Liu, Pristupa, & Niznik, 2001; Wersinger & Sidhu, 2003), le transporteur VMAT2 et avec d'autres protéines qui contribuent à la régulation de la synthèse de la dopamine telles que ERK (extra-cellular signal regulated protein kinase) ou PKC (protein kinase C) (R. G. Perez et al., 2002). Cette régulation du métabolisme dopaminergique par l'alpha-synucléine sera abordé plus en détails dans la partie III 6.

2.2.2. Les synucléinopathies

Une des caractéristiques histopathologiques de certaines maladies neurodégénératives est l'accumulation anormale et l'agrégation de certaines protéines. Dans le cas de la maladie de Parkinson, de l'atrophie multisystématisée (Multiple system atrophy - MSA) ou encore de la Démence à corps de Lewy (Lewy body dementia- LBD), il s'agit de la protéine α -syn (Spillantini et al., 1997). Ces maladies, bien qu'ayant des caractéristiques anatomiques et cliniques différentes, font partie de ce qu'on appelle les synucléinopathies (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Principales caractéristiques des différentes synucléinopathies. Adapté de (McCann, Stevens, Cartwright, & Halliday, 2014).

Caractéristiques	MP	LBD	MSA
Age au diagnostique	~ 60	~ 70	~ 60
Espérance de vie	~ 15	~ 5	~ 6-9
Symptômes moteurs	Tous	Certains	Tous
Réponse à la L-DOPA	Oui	Variable	Non

Principales cellules affectées	Neurones	Neurones	Oligodendrocytes
--------------------------------	----------	----------	------------------

En condition physiologique, l' α -syn se trouve en équilibre entre sa forme monomérique non-repliée soluble (Theillet et al., 2016) et sa forme insoluble agrégée en feuillet beta (Giasson, Murray, Trojanowski, & Lee, 2001). En revanche, lors de la maladie de Parkinson elle est majoritairement sous sa forme insoluble agrégée. Les défauts de la mitochondrie liés à la MP provoquent une accumulation de ROS. Ces ROS encouragent l'agrégation de l' α -syn qui entraîne des modifications post translationnelles telles que le clivage protéolytique, l'hyperphosphorylation (la plus connue étant la phosphorylation sur la sérine 129 - PS129), l'ubiquitination, la nitrosylation ou encore l'oxydation (Barnett, 2016).

L'agrégation de la protéine se fait en plusieurs étapes :

- Une nucléation qui permet la formation de dimères, de tétramères puis d'oligomères (50aines de monomères).
- L'assemblage d'oligomères en protofibrilles qui se polymérisent ensuite en fibres amyloïdes (**Figure 9**). 90% de l' α -syn dans les fibres est phosphorylée contre 4% pour l' α -syn libre (Hasegawa et al., 2002). Les fibres sont très stables thermodynamiquement et se révèlent très toxiques pour les neurones (Alam, Bousset, Melki, & Otzen, 2019; Melki, 2018). L' α -syn agrégée forme des inclusions appelées corps de Lewy (LB – Lewy bodies) si elles se trouvent dans le cytoplasme des neurones et neurites de Lewy (LN – Lewy neurites) si elles se trouvent dans les axones des neurones.

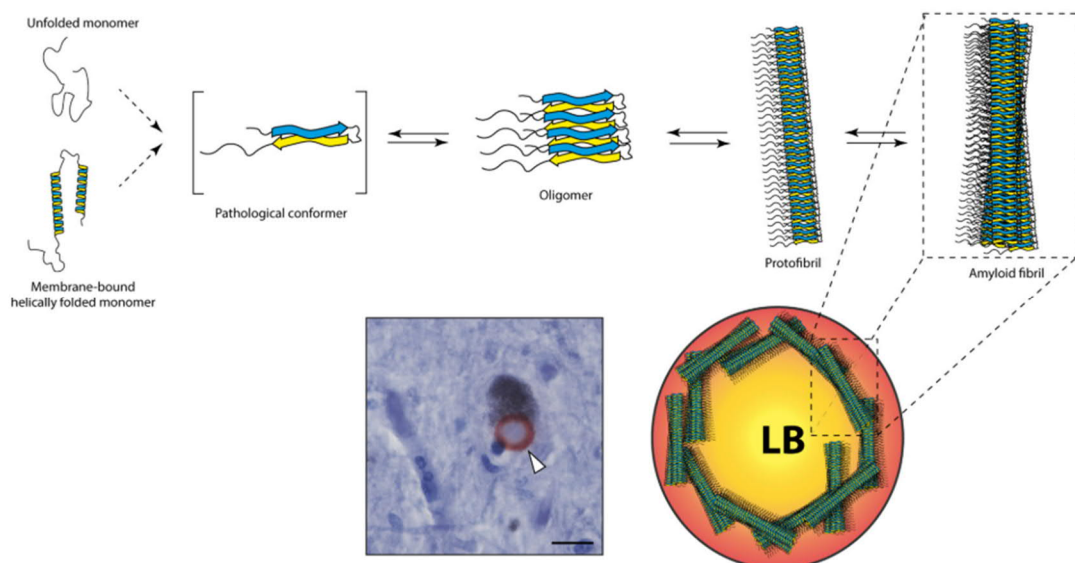


Figure 9 : Processus agrégatif de l'alpha-synucléine. D'après (Dehay et al., 2015).

Les LB peuvent être présents dans le système nerveux central (cerveaux, moelle épinière) ou périphérique (nerf vague, ganglions sympathiques, plexus cardiaque, système nerveux entérique, glandes salivaires, médulla adrénale, nerfs cutanés, nerf sciatique). Ces inclusions se retrouvent dans les neurones pour la MP et la DLB et dans les oligodendrocytes pour la MSA (dans ce cas appelées GCI).

L'évolution de la distribution de la pathologie α -syn dans l'organisme a été étudiée en détails par Braak et ses collègues (Braak et al., 2002; Braak et al., 2003). Ils ont ainsi déterminé 6 stades de la maladie selon la progression de celle-ci. A chaque nouveau stade, de nouvelles régions sont affectées et les régions déjà affectées s'empirent. Les stades sont (**Figure 10**) :

- Les stades 1 et 2 correspondent au début de la maladie. La pathologie α -syn est restreinte au niveau du tronc cérébral, du noyau olfactif et du système entérique. Des symptômes précoces comme la constipation ou l'anosmie/hyposmie peuvent être présents mais il n'y a pas de symptômes moteurs.
- Les stades 3 et 4 sont des stades plus avancés de la maladie avec l'atteinte du mésencéphale et notamment de la substance noire. C'est à partir de ce stade qu'apparaissent les symptômes moteurs et les troubles du sommeil.
- Les stades 5 et 6 correspondent à des stades très avancés de la maladie. Les régions néocorticales sont atteintes. Ces stades s'accompagnent de l'apparition progressive d'une démence et des symptômes non moteurs tardifs comme les hallucinations.

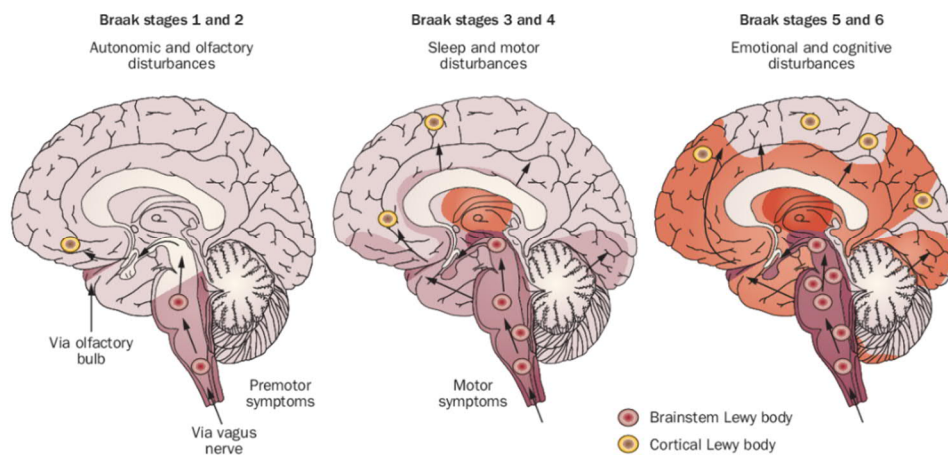


Figure 10 : Stades de propagation de la pathologie de la maladie de Parkinson selon l'hypothèse de Braak. D'après (Halliday et al., 2011).

A noter que depuis leur publication, certains groupes remettent en cause les hypothèses de Braak. En effet, il semblerait que les stades de Braak ne puissent décrire qu'une partie (50%) des patients présentant des dépôts protéiques, en particulier ceux correspondant à l'évolution des formes précoces de la maladie de Parkinson et moins à celles ayant un début tardif (Beach et al., 2009; Jellinger, 2019).

En revanche, les observations de Braak mettaient en lumière une caractéristique, à l'époque controversée, de la maladie : celle d'une progression de la maladie se faisant par transmission de l'alpha-synucléine de cellule à cellule.

2.2.3. L'hypothèse « prion like »

Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives infectieuses comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'Homme, la tremblante chez les ovins ou encore l'encéphalopathie spongiforme

bovine ou « vache folle » chez les bovins. Pour qu'une protéine soit qualifiée de type prion elle doit présenter un certain nombre de caractéristiques dont les principales sont :

- Le changement de conformation (transconformation) de la protéine physiologique vers une forme pathogénique (structure amyloïde riche en feuilletés β).
- La propagation intercellulaire, infectant de nouvelles cellules et de nouvelles structures.
- La transmission de l'information pathogénique à la forme physiologique de la cellule hôte infectée via le phénomène de transconformation.
- La forme prion doit induire de la dégénérescence cellulaire.
- Il existe différentes souches qui peuvent causer différentes pathologies.
- La transmission inter-individuelle au sein d'une même espèce voire même inter-espèce (contagiosité).

L'idée que l' α -syn se comporte comme une protéine prion est venue de l'observation d'inclusions de type LB dans des neurones mésencéphaliques d'embryons humains greffés dans le putamen de patients parkinsoniens (Kordower, Chu, Hauser, Freeman, & Olanow, 2008). Cette observation suggère que la pathologie α -syn qui était présente dans les neurones endogènes des patients a été capable de se transmettre aux neurones exogènes après leur implantation dans le cerveau des receveurs (J. Y. Li et al., 2008). Depuis, de très nombreuses études in vitro et in vivo ont démontré qu'en effet la pathologie α -syn est capable de se transmettre de cellule en cellule, de se propager et de s'amplifier. Ces études seront traitées dans la partie III de ce manuscrit.

De nombreuses études supportent donc l'hypothèse « prion like » de la pathologie α -syn même si sa contagiosité n'a jamais été démontrée jusqu'ici (Brundin, Melki, & Kopito, 2010; Melki, 2018; Siddique, 2021).

3. Symptomatologie de la maladie de Parkinson

Tout comme la progression neuroanatomique de la maladie, l'évolution des symptômes est elle aussi très progressive. Les patients parkinsoniens développent leurs premiers symptômes moteurs lorsque qu'un certain seuil de mort neuronale dopaminergique est dépassé : 70 à 80% de perte de terminaisons dans le striatum et 50 à 60% de perte neuronale dans la substance noire (Bernheimer, Birkmayer, Hornykiewicz, Jellinger, & Seitelberger, 1973). En moyenne, cela correspond entre 20 et 30 ans après le début de la maladie.

La phase avant l'apparition des symptômes moteurs est appelée asymptomatique ou prodromale (Postuma et al., 2012) (**Figure 11**). Durant cette phase, certains symptômes non-moteurs (Non-motor symptoms – NMS) sont déjà présents. Cette phase est particulièrement intéressante d'un point de vue

thérapeutique. En effet, une meilleure détection et caractérisation de ces symptômes précoces pourrait avancer le diagnostic et les traitements, notamment les traitements neuroprotecteurs ou permettant de ralentir l'évolution de la maladie (« disease modifiers »).

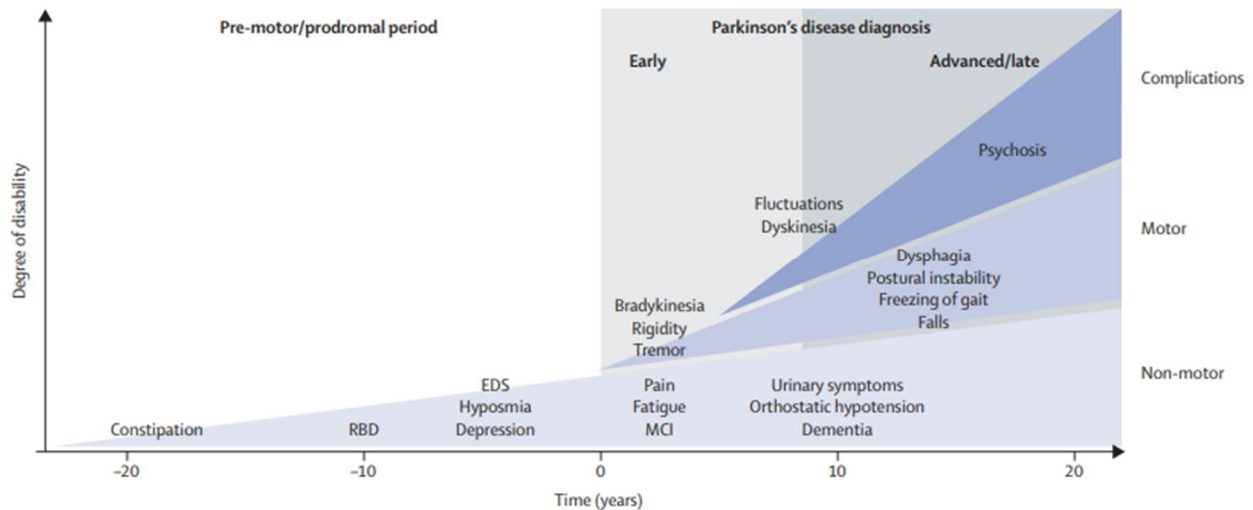


Figure 11 : Apparition des symptômes et progression de la maladie de Parkinson. D'après (L. V. Kalia & Lang, 2015).

0 = diagnostic lors de l'apparition des symptômes moteurs, EDS=excessive daytime sleepiness, MCI=mild cognitive impairment, RBD=REM sleep behavior disorder.

3.1. Les symptômes moteurs

Les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson sont nombreux (**Figure 12**). Ce sont les plus visibles et les plus caractéristiques de la maladie.

On distingue quatre symptômes moteurs cardinaux :

- La bradykinésie/akinésie
- La rigidité musculaire
- Le tremblement au repos
- L'instabilité posturale

La bradykinésie correspond à un ralentissement des mouvements. C'est l'un des symptômes les plus répandus et l'un des plus précoces. La bradykinésie est très souvent liée à une akinésie. L'akinésie est la difficulté d'initier un mouvement. Les patients présentent des difficultés à différents niveaux : la planification, l'initiation et l'exécution du mouvement. Ces difficultés sont accentuées s'il faut effectuer des mouvements simultanés, des séquences de mouvements différents ou des mouvements qui demandent de la précision.

La rigidité musculaire correspond à une hypertonie généralisée des muscles. Cela participe également à la difficulté d'effectuer des mouvements. Cette rigidité peut créer à long terme des douleurs articulaires

voir des crampes. La rigidité musculaire peut se situer au niveau de n'importe quel muscle du corps mais est particulièrement présente au niveau des épaules et du cou.

Le tremblement est un tremblement de repos, c'est à dire qu'il disparaît lors du mouvement volontaire. C'est le symptôme le plus connu du grand public alors que tous les patients n'en souffrent pas (15 à 30% n'en souffrent pas). C'est un tremblement lent, et peu ample (dont la fréquence se situe entre 4 et 6 hertz). Le tremblement débute classiquement d'un côté du corps et se propage de l'autre côté au fur et à mesure de la progression de la maladie, on parle de manifestation asymétrique. Le plus souvent les tremblements commencent au niveau des extrémités, notamment des mains ou des doigts, puis se propagent aux bras, jambes, pieds et parfois même au visage. Les tremblements peuvent apparaître après plusieurs années.

L'instabilité posturale correspond à un trouble de la posture et de l'équilibre. Les problèmes d'équilibre engendrent très fréquemment des chutes. L'instabilité posturale arrive souvent plus tard dans la maladie, une fois que les autres symptômes sont déjà bilatéraux. Elle s'aggrave avec la progression de la maladie (Jankovic, 2008).

En plus de ces quatre symptômes moteurs majeurs, les patients parkinsoniens souffrent aussi de troubles de la marche, de troubles de la posture (antéflexion), de piétinements (pieds trainants) ou encore de troubles du balancement des bras. Certains troubles sont plus épisodiques comme le "freezing" (brefs épisodes où les personnes sont bloquées, comme si leurs pieds restaient coincés au sol) ou la festination (petits pas plus rapides entraînant vers l'avant). Le freezing est présent chez 50% des patients.

Les patients parkinsoniens souffrent également de symptômes moteurs dits secondaires tels que des difficultés à parler, à déglutir, les changements de voix (plus monotone), la perte de la dextérité fine, la perte d'expression faciale, des modifications de l'écriture (micrographie, écriture qui devient de plus en plus petite) ou encore l'altération du clignement des yeux et des mouvements des yeux (blink reflex).

Cette symptomatologie varie beaucoup d'un patient à l'autre. Tous les symptômes décrits ci-dessus ne sont pas présents chez tous les patients et leur intensité varie également.



Figure 12 : Symptômes moteurs typiques du patient parkinsonien. D'après (Murayshid et al., 2020).

3.2. Les symptômes non-moteurs

Certains symptômes non-moteurs de la maladie de Parkinson ont été observés à l'époque de James Parkinson, notamment la perturbation du sommeil et les problèmes intestinaux. Il existe plusieurs types de NMS : sensoriels, autonomiques, cognitifs ou psychiatriques. Ils sont très impactants sur la qualité de vie et sont d'ailleurs souvent moins bien tolérés par les patients que les symptômes moteurs (Martinez-Martin, 2011; K. M. Prakash, Nadkarni, Lye, Yong, & Tan, 2016).

Le nombre de patients ayant des NMS est difficile à évaluer mais il s'agirait de 70 à 90% des patients (Chaudhuri, Healy, & Schapira, 2006; T. M. Zhang et al., 2016). Comme pour les symptômes moteurs, il existe une grande hétérogénéité entre les patients, mais leur prévalence et leur intensité augmente avec la progression de la maladie. Comme déjà évoqué, ils ne sont pas uniquement liés à la dégénération dopaminergique. Les atteintes d'autres systèmes de neurotransmission, et plus particulièrement le système sérotoninergique, jouent également un rôle important dans l'initiation et l'évolution de ces symptômes (Chaudhuri et al., 2006). A noter que les NMS peuvent être liés à la maladie de Parkinson directement ou être également le fait d'effets secondaires indésirables associés aux traitements.

3.2.1. Les dysfonctionnements sensoriels

Les troubles olfactifs sont présents chez la plupart des patients parkinsoniens (Doty, 2012). Cela peut aller de l'hyposmie (réduction de la sensibilité à certaines odeurs) jusqu'à l'anosmie (perte de l'habilité à détecter certaines ou toutes les odeurs). L'hyposmie est un phénomène présent chez les personnes âgées en général mais dans une moindre proportion. L'hyposmie des patients parkinsoniens s'empire avec la progression de la maladie (Sasaki & Horie, 2020) et est corrélé au déclin cognitif et à la démence (Yoo et al., 2019).

La vision est aussi altérée dans la maladie de Parkinson. Cela n'est pas uniquement due aux clignements et mouvements anormaux des yeux mais aussi à des déficits au niveau de la rétine, en particulier des cellules amacrines I et II dopaminergiques (Moschos et al., 2011). Ainsi, il a été rapporté une baisse de l'acuité visuelle et de la sensibilité aux contrastes (Ortuño-Lizarán et al., 2020). Quant à la perception des couleurs, les études ne vont pas toutes dans le même sens. Certaines affirmant qu'il existe des déficits de discrimination des couleurs (Price, Feldman, Adelberg, & Kayne, 1992; Regan, Freudenthaler, Kolle, Mollon, & Paulus, 1998) et d'autres non (Bertrand et al., 2012; Pieri, Diederich, Raman, & Goetz, 2000).

3.2.2. Les dysfonctionnements autonomiques

Les dysfonctionnements autonomiques liés à la MP sont nombreux. On y retrouve : la constipation, les perturbations sexuelles, la sudation excessive, les perturbations du sommeil, les nausées, les dysfonctionnements urogénitaux, une salivation anormale, une fréquence cardiaque anormale ou encore une hypotension orthostatique (qui peut causer des vertiges et des syncopes). Parmi ces symptômes, les patients souffrent beaucoup de l'altération de leur sommeil. En effet, le cycle circadien est perturbé dans la MP. Près de la moitié des patients ont des périodes de somnolence pendant la journée et, à l'inverse, des périodes d'insomnie pendant la nuit. Ils sont aussi sujets à des comportements anormaux pendant leur sommeil appelés parasomnies. En plus des insomnies et parasomnies, leur phase de sommeil paradoxal est réduite et certains patients présentent un syndrome de type restless legs syndrome (syndrome des jambes sans repos). Ceci participe grandement à la fatigue ressentie par les patients (Gros & Videnovic, 2017; Iranzo, 2011, 2013; Y. Shen, Huang, Li, & Liu, 2018; Stefani & Högl, 2020). Avec la constipation, les troubles du sommeil sont souvent observés durant la phase prodromale de la maladie.

Le fait que la dopamine joue un rôle important dans le processus circadien (Wisor et al., 2001) en modulant l'expression de certains gènes spécifiques de ce processus (Imbesi et al., 2009), n'est certainement pas étranger à ces perturbations du sommeil.

3.2.3. Les dysfonctionnements cognitifs

Les symptômes cognitifs de la MP sont principalement liés à l'atteinte du cortex frontal. Les principales fonctions impactées sont les mécanismes attentionnels et la mémoire de travail. Ceci engendre dans la vie de tous les jours des problèmes pour se concentrer et garder le fil de sa pensée.

D'une façon générale, ce sont les fonctions exécutives qui sont le plus impactées. Les patients parkinsoniens souffrent de troubles de la planification et de l'organisation. Cela leur est d'autant plus difficile s'ils doivent faire plusieurs tâches en même temps. D'autres fonctions non dépendantes du cortex frontal peuvent être atteintes. C'est le cas du langage qui dépend du lobe temporal. Les patients peuvent avoir des difficultés pour trouver leurs mots. La mémoire, dépendante du lobe temporal et de l'hippocampe, peut aussi être atteinte avec des difficultés pour apprendre de nouvelles tâches, se rappeler de faits ou d'évènements ou encore faire des tâches de mémoire.

Le nombre de patients atteints de déficits cognitifs légers est évalué à 20-30%. Le fait d'avoir des déficits cognitifs légers est un facteur de risque de développer une démence qui est présente chez 80% des

patients parkinsoniens à des stades très avancés (plus de 20 ans de maladie) (Goldman et al., 2018; N. Prakash, McFarthing, & Simuni, 2020).

3.2.4. Les dysfonctionnements psychiatriques

Les principaux symptômes psychiatriques de la maladie de Parkinson sont : l'apathie ou anhédonie, la dépression, l'anxiété et les psychoses.

L'apathie correspond à une baisse/perte de motivation qui persiste dans le temps. Cette apathie peut être associée ou non à une dépression et à la fatigue (Skorvanek et al., 2015). De façon générale, toutes les actions dirigées vers un but sont diminuées ainsi que les émotions qui leurs sont liées. Il est très difficile d'établir la prévalence de l'apathie dans la MP et selon les articles elle est présente chez 15 à 70% des patients (Pagonabarraga, Kulisevsky, Strafella, & Krack, 2015). Il a été prouvé que l'apathie est un symptôme qui survient assez tôt dans la maladie et que celle-ci est prédictive du déclin cognitif (Dujardin, Sockeel, Delliaux, Destée, & Defebvre, 2009).

Comme pour l'apathie, la prévalence de la dépression est difficile à évaluer et se situerait selon les auteurs entre 10 et 90% des patients. Elle est elle aussi prédictive du déclin cognitif (Schrag & Taddei, 2017).

L'anxiété est présente chez 5 à 40% des patients. Elle peut être générale ou prendre la forme de crises de panique ou de phobies (Dissanayaka et al., 2010).

Enfin, les patients peuvent également souffrir de psychose, dont les formes les plus courantes sont les hallucinations visuelles ou auditives. On parle de psychose si le patient montre des hallucinations, des illusions ou de fausses sensations de présence et que ces symptômes sont récurrents ou présents en continue depuis plus d'un mois (Ravina et al., 2007). Contrairement à l'apathie, la dépression et l'anxiété, qui se développent assez précocement, les épisodes psychotiques se développent à des stades plus avancés de la maladie et notamment lorsque les patients sont sous traitements, ce qui pourrait être liés à des effets secondaires médicamenteux.

4. Traitements de la maladie de Parkinson

Pour le moment, il n'existe aucun traitement curatif de la maladie de Parkinson. Les traitements existants sont majoritairement symptomatiques avec pour but principal de réduire, et au mieux éliminer, certains symptômes. En aucun cas, les traitements existants permettent d'arrêter voire même de ralentir l'évolution de la maladie.

Les quatre principaux types de thérapie traitant les symptômes de la MP sont :

- Les pharmacothérapies
- Les traitements chirurgicaux

- Les thérapies géniques et cellulaires
- Les thérapies « disease modifiers »

4.1. Les pharmacothérapies

Le principal traitement de la maladie de Parkinson est la prise orale de L-DOPA (ou Levodopa). Il s'agit d'une thérapie dite substitutive, dont le but est de rétablir le taux de dopamine dans le striatum. On ne peut pas administrer directement de la dopamine car cette molécule ne passe pas librement la barrière hémato encéphalique (BHE). C'est donc son précurseur, la L-DOPA, capable de franchir la BHE, qui est administré oralement. Cependant la L-DOPA peut être transformée en dopamine par l'enzyme dopa décarboxylase située au niveau périphérique avant son passage dans le cerveau. La prise de L-DOPA est donc couplée avec celle d'inhibiteurs de cette dopa décarboxylase (i.e. bensérazide par exemple) pour faciliter son passage dans le cerveau (Papavasiliou et al., 1972). De même, la L-DOPA peut être dégradée avant son passage dans le cerveau par la catéchol-O-méthyltransférase (COMT). Le traitement des malades inclut souvent l'utilisation d'inhibiteurs de la COMT (i.e. entacapone par exemple). Une fois dans le cerveau, la L-DOPA est convertie en dopamine par l'enzyme AADC des neurones dopaminergiques. Ainsi, le tonus dopaminergique est restauré, les symptômes sont très largement réduits et la qualité de vie des patients est nettement améliorée (Sethi, 2010). La bradykinésie et la rigidité répondent bien à ce type de traitement alors que c'est plus aléatoire pour les tremblements (L. V. Kalia & Lang, 2015). Cette phase dénommée « la lune de miel » persiste en moyenne 5 à 10 ans mais dans 20% des cas elle ne dure qu'un an (Nutt, 2001). Après ces quelques années, la L-DOPA devient moins efficace et les doses nécessitent d'être augmentées pour atteindre le même niveau d'efficacité thérapeutique (Mouradian, Juncos, Fabbrini, & Chase, 1987; Poewe & Mahlknecht, 2009). Avec la durée du traitement L-DOPA on observe une perte progressive d'efficacité du traitement pour deux principales raisons :

- Les niveaux d'AADC dans le striatum baissent à cause de la progression de la maladie et n'y a plus assez d'enzyme endogène pour transformer la L-DOPA.
- L'administration discontinue de L-DOPA résultant des prises orales quotidiennes provoque des phénomènes de fluctuations motrices (**Figure 13**). Juste après la prise de L-DOPA, les patients retrouvent des périodes d'activité locomotrice satisfaisantes appelées phases "ON". Aux heures plus éloignées de la prise de L-DOPA, ils retombent dans des périodes de très faible activité locomotrice appelées phases "OFF". Durant les périodes ON, les patients développent des dyskinésies appelées LIDs (L-DOPA induced dyskinesias). Ces dyskinésies correspondent à des périodes de pic de dose (ou surdosage) durant lesquelles la dopamine est produite en excès et induit des mouvements involontaires. Durant les périodes OFF les patients sont très fortement akinétiques/bradykinétiques, rigides et montrent très fréquemment des problèmes d'équilibre. Ces fluctuations motrices entre phase ON et phase OFF sont très invalidantes pour les patients et diminuent grandement leur qualité de vie.

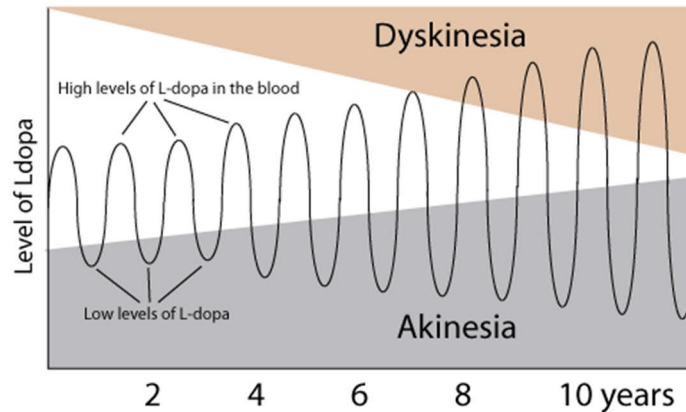


Figure 13 : Fluctuations motrices dues au traitement oral de L-DOPA dans le cadre de la maladie de Parkinson.

Afin de diminuer ces effets ON/OFF, le timing d'administration de la L-DOPA doit-être fréquemment réévalué et adapté à la situation de chaque patient. La prise de L-DOPA peut par exemple être fractionnée en 4, 5 voire 6 prises par jour. Des formules longue action de la L-DOPA ont été développées pour réduire au maximum les périodes OFF de traitement (Hauser et al., 2013). De plus en plus d'études portent sur la mise en place d'une administration de L-DOPA en continue. Des pompes ont été proposées, permettant d'administrer de la L-DOPA en continu au niveau de l'intestin (Duodopa, levodopa-carbidopa en gel) et il a été prouvé que cette approche réduit les fluctuations et certains effets indésirables comme l'impulsivité (Catalán et al., 2013).

La L-DOPA agit de manière globale sur la synthèse de dopamine et ne cible pas le striatum de façon sélective. Ainsi, la L-DOPA thérapie montre des effets néfastes dus à une surexpression de la dopamine dans certaines régions du cerveau ou en périphérie. Parmi ces effets indésirables on note : les nausées (dus à l'action de la dopamine sur les récepteurs dopaminergiques de la paroi de l'estomac), l'hypotension orthostatique (due aux récepteurs dopaminergiques vasculaires) ou encore la somnolence.

Du fait de ces effets néfastes, et des problèmes liés au dosage intermittent de la L-DOPA, les traitements avec des agonistes de la dopamine, comme l'apomorphine et la rotigotine, sont privilégiés dans un premier temps (Jankovic & Aguilar, 2008). Ces agonistes dopaminergiques vont se fixer sur les récepteurs post synaptiques D2 de la dopamine en les stimulant, mimant l'effet de la dopamine. L'effet est encore plus rapide que celui de la L-DOPA car il n'y a pas besoin de transformer la L-DOPA en dopamine, qu'elle soit larguée dans la synapse et qu'elle se fixe aux récepteurs. Ces agonistes se révèlent très utiles pour calmer les symptômes rapidement. Les agonistes dopaminergiques peuvent être utilisés seuls au début de la maladie chez des patients jeunes, ou en association avec la L-DOPA, ce qui permet d'en diminuer le dosage et les effets dyskinétiques. En revanche, les agonistes dopaminergiques présentent les mêmes effets indésirables que le surdosage L-DOPA (nausées, vertiges, somnolence) et, à forte doses, peuvent également être responsables de troubles de l'humeur, de comportements impulsifs/compulsifs et de l'apparition d'hallucinations.

Sur le même principe que les inhibiteurs de la dopa décarboxylase périphérique, on peut combiner la prise de L-DOPA avec des inhibiteurs des enzymes de dégradation de la dopamine dans le cerveau. Il s'agit d'inhibiteurs de la COMT (précédemment évoqués) ou de la MAO-B (i.e. rasagiline par exemple).

Ces molécules permettent de réduire la dégradation de la dopamine dans le cerveau et donc d'augmenter sa disponibilité (Goldenberg, 2008). Ces deux inhibiteurs sont le plus souvent utilisés en association avec la L-DOPA lorsque le patient présente des fluctuations motrices mais ils peuvent également être utilisés seuls au lorsque les symptômes sont peu gênants au tout début de la maladie. Les effets indésirables de ces inhibiteurs sont des diarrhées, des mouvements involontaires et des épisodes de confusion.

Enfin, des antagonistes des récepteurs NMDA et des antagonistes cholinergiques ont été utilisés pour réduire l'importance des LIDs (Paquette et al., 2012).

En résumé, au début de la maladie lorsque les symptômes deviennent gênants, l'administration des agonistes dopaminergiques est souvent le traitement de choix. Lorsque les agonistes deviennent mal tolérés ou deviennent moins efficaces alors ils peuvent être associés ou remplacés par la L-DOPA. Lorsque la L-DOPA est à son tour mal tolérée ou moins efficace alors elle est associée à des inhibiteurs des enzymes de dégradation de la dopamine ou des antagonistes cholinergiques afin de prolonger son effet thérapeutique (Gray et al., 2014; Raza, Anjum, & Shakeel, 2019).

Alors que l'effet des traitements dopaminergiques sur l'amélioration des symptômes moteurs est indéniable, leurs effets sur les symptômes non-moteurs sont moins clairs (Cools, 2006). De plus, des effets bénéfiques comme délétères associés à leur utilisation ont été décrits (Cools, Barker, Sahakian, & Robbins, 2003). Cela dépend du symptôme pris en compte, de la combinaison de traitements administrés, de la sensibilité du patient, mais aussi du stade d'évolution de la maladie. En général, les fonctions liées au striatum dorsal (sensorimoteur, voir fig. 8) qui est le plus touché dans la maladie de Parkinson, vont être améliorées alors que les fonctions liées au striatum ventral (limbique, fig. 8) vont être détériorées. En effet, l'apport de L-DOPA dans ces régions ventrales, touchées plus tardivement, peut engendrer un excès de dopamine dans ces régions et une dérégulation des fonctions qui lui sont associées (Ondo, 2011).

L'un des effets indésirables non-moteurs les plus communs est l'altération de la prise de décision et notamment de l'évaluation des risques et des bénéfices. Cela est dû à une modification de la sensibilité à la récompense qui augmente la prise de risques (Santangelo, Barone, Trojano, & Vitale, 2013). Les patients sous traitement dopaminergique, et particulièrement sous agonistes dopaminergiques, développent aussi des troubles du contrôle de l'impulsivité et de la compulsion. Les patients qui en souffrent ont du mal à résister à une impulsion, une envie de réaliser une tâche qui leur procure du plaisir même si les conséquences leurs sont néfastes. Cela peut se présenter sous plusieurs formes (dans l'ordre du plus répandu au moins répandu) : pari compulsif, hypersexualité, shopping compulsif ou encore alimentation compulsive. Une étude de 2010 chez 3000 patients sous traitement a évalué à 14% le nombre de patients ayant ce type de trouble comportemental pour les patients sous traitements dopaminergique et 17% pour les patients traités avec des agonistes (Weintraub et al., 2010). L'effet a été démontré comme étant dose dépendent (Corvol et al., 2018). Les patients les plus touchés par ces troubles compulsifs sont les jeunes hommes avec un début précoce de la maladie et de sévères symptômes cognitifs (Voon et al., 2017). Une autre étude a démontré que 40% des patients sous agonistes dopaminergiques n'ayant pas de troubles compulsifs à la base, en développent dans les quatre ans qui suivent le début du traitement (Bastiaens, Dorfman, Christos, & Nirenberg, 2013). Les traitements dopaminergiques, et encore une fois surtout les agonistes dopaminergiques, déclenchent également chez la moitié des patients des psychoses et notamment des hallucinations. Cette fois ci ce sont les

personnes les plus âgées, à des stades plus avancés de la maladie qui sont les plus touchées. L'arrêt de ces traitements engendre chez 20% des patients de l'anxiété, de l'apathie, des phobies, de la fatigue, des dépressions, des douleurs ou encore des nausées (Rabinak & Nirenberg, 2010). Des antidépresseurs (inhibiteurs de la réabsorption de la sérotonine) ont été utilisés pour traiter les dépressions.

Les traitements pharmacologiques ne peuvent pas arrêter ou modifier les causes ou l'avancée de la maladie, mais malgré leurs défauts, ils améliorent significativement la qualité de vie des patients, ils sont peu invasifs et ils demeurent les traitements de référence au stade débutant de la maladie.

4.2. Les traitements chirurgicaux

Dans les années 50, les tout premiers traitements chirurgicaux de la MP visaient à inactiver par lésions électriques ou mécaniques certaines structures des ganglions de la base jugées hyperactives telles que le pallidus interne ou le thalamus (Krayenbuhl & Yasargil, 1960; Matera, Outes, Rios, & Barboza, 1962; Page, 1992). En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'activité de ces régions est modifiée au cours de la maladie, ce qui a pour conséquence de limiter l'activation corticale, à l'origine des symptômes de la maladie. A l'origine, ces traitements chirurgicaux irréversibles (lésions) engendraient parfois des effets indésirables irréversibles tels que des paralysies ou des pertes de sensibilités. Ils furent donc provisoirement abandonnés à la suite de la découverte des pharmacothérapies et notamment de la L-DOPA.

Après quelques années de progrès technologiques et en particulier de la découverte des effets inhibiteurs sur l'activité électrique des neurones d'une stimulation à haute fréquence, un neurochirurgien Français Alim-Louis Benabid montra que la stimulation haute fréquence (130Hz) du thalamus pouvait entraîner une disparition des tremblements (Benabid, Pollak, Louveau, Henry, & de Rougemont, 1987). La DBS (Deep Brain Stimulation) était née et avec elle, une nouvelle approche permettant l'amélioration des symptômes moteurs. De nos jours, la DBS est pratiquée au niveau du NST ou du GPi.

Le principe de la DBS est d'implanter de fines électrodes dans une région précise du cerveau, qui dans le cas de la MP sont le NST et le GPi. Ces électrodes sont reliées à un stimulateur (placé généralement au niveau de la clavicule) et vont délivrer un courant électrique qui inhibe les neurones environnants (**Figure 14**). La fréquence et l'intensité des stimulations peuvent être modifiées pour s'adapter à chaque patient et peuvent être différentes d'un hémisphère à l'autre.

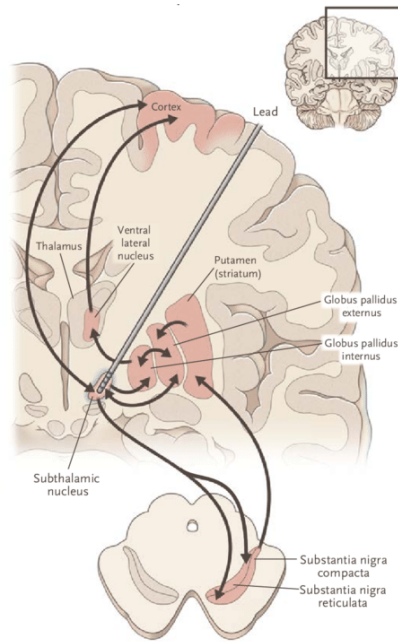


Figure 14 : DBS au niveau du NST. D'après (DeLong & Wichmann, 2015).

La DBS est très efficace pour réduire les symptômes moteurs tels que les tremblements, l'akinésie ou la rigidité et les périodes OFF amenant à une forte amélioration de la qualité de vie des patients. L'efficacité est la même que la stimulation soit pratiquée au niveau du NST ou du GPI (Follett et al., 2010). Généralement, les symptômes qui répondent bien à la L-DOPA sont ceux qui répondent le mieux à la DBS. La DBS permet ainsi de réduire la prise de L-DOPA de 50 à 80% et dans quelques cas de la supprimer totalement. Cela permet de réduire les effets secondaires associés, notamment les dyskinésies (S. K. Kalia, Sankar, & Lozano, 2013). En revanche, certains groupes ont noté des effets néfastes comme des problèmes d'équilibre (Fasano, Daniele, & Albanese, 2012). Pour prendre en charge certains symptômes comme les troubles de l'équilibre et de la coordination il est également possible de stimuler à basse fréquence le noyau pédiculopontin.

Les effets de la DBS sur les NMS sont moins clairs et plus débattus. Leurs effets dépendraient de la localisation de la stimulation, du patient ou encore du traitement pharmacologique associé (Bardon et al., 2020; Petry-Schmelzer et al., 2019). Certains groupes ont démontré une amélioration des symptômes liés au sommeil, à l'anxiété, à la dépression et aux comportements compulsifs (Abbes et al., 2018; Accolla & Pollo, 2019; Fasano et al., 2012). Les fonctions cognitives semblent inchangées alors que la diminution de la fluence verbale et l'apathie pourraient s'aggraver sous DBS (Kurtis, Rajah, Delgado, & Dafsari, 2017).

Les effets néfastes peuvent être dus au fait que la DBS n'agit pas de manière sélective sur les neurones hyperactifs du noyau stimulé mais également sur les neurones au voisinage des électrodes. Pour limiter ces effets secondaires, des améliorations ont été apportées sur les électrodes qui sont maintenant directionnelles (et plus radiales) et sur leur localisation afin de mieux cibler et de mieux s'adapter à chaque patient (Thenaisie et al., 2021; Wu et al., 2015).

La DBS a de nombreux avantages dont les principaux sont qu'elle est réversible (en arrêtant la stimulation) et adaptable à chaque patient (en modifiant la fréquence ou l'intensité de la stimulation).

C'est une technique qui est maintenant très sûre et dont les effets sont immédiats et durables. En revanche, elle reste invasive et n'est pas adaptée au traitement de la totalité des patients.

La DBS utilise l'électricité comme mode de stimulation mais il est également possible de rendre des neurones sensibles à la lumière et de les stimuler via des faisceaux optiques. C'est ce qu'on appelle l'optogénétique. Pour le moment des essais sont en cours chez le primate mais ils ne sont pas concluants notamment à cause de problèmes technologiques qu'il reste à résoudre (Bardon et al., 2020; Senova et al., 2018; Yu, Cassar, Sambangi, & Grill, 2020).

La DBS reste le principal traitement chirurgical mais des procédures ablatives utilisant la radiofréquence, la radiochirurgie ou les ultrasons sont aussi utilisées dans de plus rares cas pour traiter les tremblements (Witjas-Slucki, 2018). Ces techniques peuvent être utilisées pour les candidats qui ne correspondent pas aux critères de sélection pour une DBS.

A noter que toutes ces thérapies sont à visée symptomatiques mais il existe des thérapies qui modifient l'évolution de la maladie telle que la thérapie cellulaire.

4.3. Les thérapies géniques et cellulaires

La thérapie cellulaire, déjà utilisée dans d'autres domaines comme la maladie de Huntington, les accidents vasculaires cérébraux ou encore les traumatismes crâniens, est en développement depuis 40 ans pour la MP et toujours en plein essor. La stratégie est de transplanter des neurones dopaminergiques au niveau du striatum, qui pourront alors y produire de la dopamine et donc améliorer les symptômes de la maladie.

Lors des premiers essais de thérapie cellulaire en 1979, des neurones dopaminergiques de rat ont été transplantés chez des modèles rongeurs parkinsoniens et leurs symptômes moteurs ont été améliorés (Perlow et al., 1979).

Chez l'homme de nombreux types cellulaires, produisant de la dopamine, ont été utilisés comme les neurones périphériques sympathiques, les cellules de la médullo-surrénale, les cellules des corps carotidiens ou les cellules épithéliales de la rétine. Ces différentes transplantations n'ont apporté que peu de bénéfice car la survie cellulaire fut très faible (Goetz et al., 1991; Gross et al., 2011; Mínguez-Castellanos et al., 2007).

Par la suite, des essais ont été fait avec des cellules fœtales provenant du mésencéphale ventral. Ainsi, il a été démontré que les greffons de neurones dopaminergiques issus de fœtus pouvaient s'implanter et réinnervent le striatum, restaurer le tonus dopaminergique et survivre sur le long terme. Chez certains patients parkinsoniens, il a été ainsi possible, d'observer une amélioration des symptômes et de la qualité de vie (Freed et al., 2001; W. Li et al., 2016; Lindvall et al., 1990; Lindvall et al., 1988; Ma et al., 2002; Madrazo et al., 1988; Olanow et al., 2003). Cependant ces effets sont dépendants du stade d'évolution de la maladie (meilleurs résultats pour les patients les plus jeunes) et de la qualité des transplants utilisés. Il a ainsi été observé qu'avec certaines dissections de mésencéphale ventral incluant des neurones sérotoninergiques ou un mauvais placement des greffons dans la partie caudale du striatum des dyskinésies apparaissent (T. Carlsson et al., 2006; Carta, Carlsson, Muñoz, Kirik, & Björklund, 2010). De plus, l'utilisation de cellules mésencéphaliques fœtales pose plusieurs problèmes : 1)

l'approvisionnement de tissu fœtal en quantité suffisante (pour une réinnervation striatale suffisante il faut typiquement 3 fœtus par hémisphère) 2) les problèmes éthiques liés à l'utilisation de fœtus issus d'avortement 3) des problèmes techniques de reproductibilité entre centres de transplantation concernant les tissus disséqués, leur conservation et leur transplantation (Buttery & Barker, 2020).

Pour ces différentes raisons, les études actuelles tendent à utiliser des cellules souches pluripotentes induites associées à un protocole de différenciation en neurones dopaminergiques. Ces cellules proviennent de blastocytes et de fibroblastes du patient lui-même ou bien d'un donneur. Ces cellules souches sont plus disponibles, peuvent être caractérisées et cryoconservées, et leur différenciation est plus reproductible et de meilleure qualité. La transplantation de cellules souches pluripotentes induites dans le striatum de primate parkinsonien a donné de bons résultats en termes de survie à long terme et d'efficacité thérapeutique (Emborg et al., 2013; Kikuchi et al., 2017). Un essai clinique est actuellement en cours au Japon et un autre en préparation aux USA.

La thérapie cellulaire est très prometteuse, surtout pour de jeunes patients, mais nécessite encore quelques améliorations notamment quant à la survie des cellules sur le long terme. Il est possible de co-injecter des facteurs trophiques pour améliorer cette survie cellulaire (Zhou et al., 2013). De plus, les cellules injectées peuvent capter la pathologie alpha-synucléine provenant des cellules endogènes du patient (Kordower et al., 2008). Cela reste donc un traitement symptomatique au vu des sites de transplantation et puisque la pathologie continue de se développer.

De nombreux efforts sont réalisés pour améliorer l'efficacité des thérapies cellulaires. Dans le futur le but serait de reprogrammer des cellules in situ sans passer par des greffons. Il serait alors, par exemple, possible de reprogrammer des cellules gliales endogènes en neurones dopaminergiques. Cette stratégie est déjà à l'essai au stade préclinique dans des modèles animaux (Parmar, Grealish, & Henchcliffe, 2020; Yasuhara, Kameda, Sasaki, Tajiri, & Date, 2017).

L'utilisation de thérapies géniques dans le traitement de la maladie de Parkinson sera abordée dans la Partie II de ce manuscrit.

4.4. Les autres types de thérapies

D'autres stratégies ciblent la protéine α -syn et visent à ralentir ou stopper son accumulation dans le cerveau des patients et ainsi modifier la progression de la maladie (stratégie « disease modifiers »). Ainsi, plusieurs stratégies sont actuellement envisagées (**Figure 15**) :

- Réduire l'expression de l' α -syn en utilisant des ARN interférents (ARNi) ou des oligonucléotides antisens (ASOs) (Khodr, Becerra, Han, & Bohn, 2014).
- Moduler ses modifications post traductionnelles comme par exemple sa phosphorylation.

- Inhiber son agrégation en dissociant les agrégats existants avec de petites molécules interférantes.
- Réduire la propagation de l' α -syn en bloquant les récepteurs alpha-synucléine.
- Augmenter sa dégradation en utilisant des anticorps contre l' α -syn (Lindström et al., 2014; Masliah et al., 2005) ou bien en incitant sa dégradation par les voies autophagiques lysosomales et ubiquitine-protéasome.

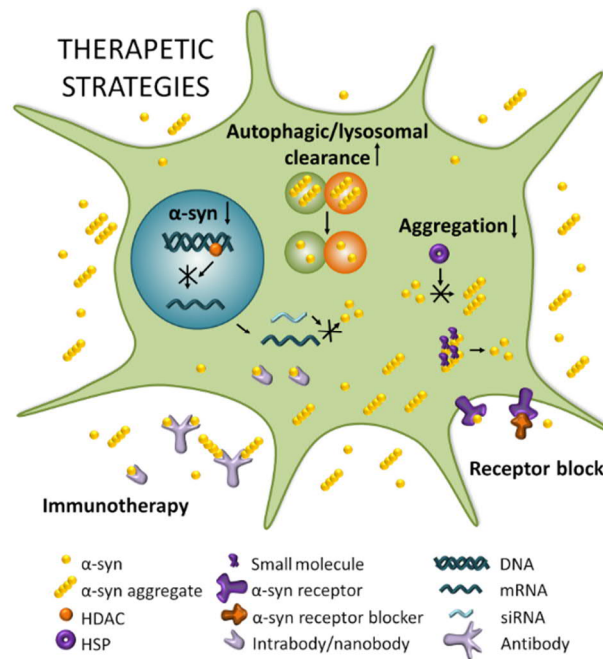


Figure 15 : Différentes stratégies ciblant la progression de la pathologie alpha-synucléine.
D'après (Fields, Bengoa-Vergniory, & Wade-Martins, 2019).

La plupart de ces stratégies sont en essai préclinique chez le rongeur ou chez le primate tandis que l'immunothérapie est actuellement en essai clinique (Olanow & Kordower, 2017; Schenk et al., 2017).

Ceci illustre l'importance des modèles animaux dans la recherche préclinique et l'importance de disposer de modèles à la fois pertinents et prédictifs, permettant une translation efficace des stratégies précliniques vers des applications cliniques.

5. Les modèles animaux de la maladie de Parkinson

Les premiers modèles animaux de la maladie de Parkinson qui ont été développés sont des modèles induits par des neurotoxines (Burns et al., 1983; Sanberg, 1980; Simola, Morelli, & Carta, 2007;

Ungerstedt, 1968; Ungerstedt, Ljungberg, & Steg, 1974). Ces modèles bien qu'ayant de nombreux avantages ont aussi leurs limites. Grâce à l'évolution de la technologie et de la connaissance de la maladie, de plus en plus de laboratoires développent de nouveaux modèles animaux, notamment par manipulation génétique ou pas surexpression de protéines, dans le but de complètement reproduire la maladie de Parkinson (**Figure 16**).

Il ne s'agit pas ici de décrire dans le détail l'ensemble de ces modèles mais surtout d'évoquer dans les grandes lignes leur grande diversité et leurs principales limitations.

Ainsi, tous les modèles à ce jour reproduisent la pathologie ou la symptomatologie de la MP que de manière partielle, le choix du modèle se faisant donc en fonction de l'hypothèse testée.

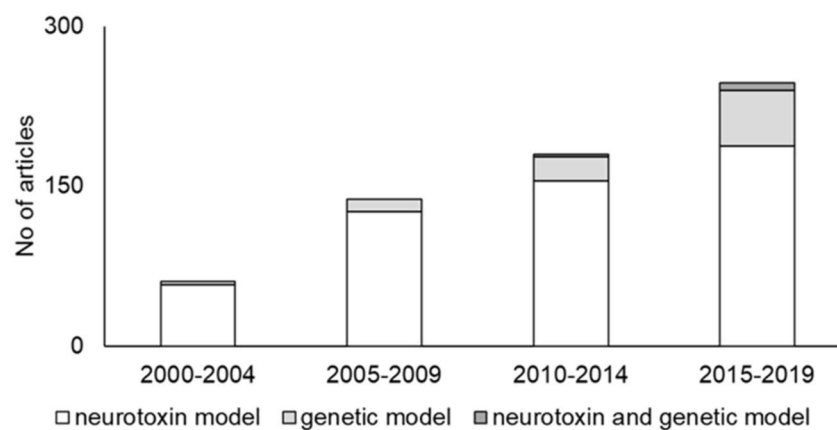


Figure 16 : Nombre d'études utilisant soit des neurotoxiques, soit des modifications génétiques, soit un mélange des deux pour engendrer un modèle animal de la MP entre 2000 et 2019. D'après (Kin, Yasuhara, Kameda, & Date, 2019).

5.1. Les modèles induits par neurotoxines

Ce sont les premiers modèles développés et, pour certains, encore les plus largement utilisés aujourd'hui (Kin et al., 2019). Un grand nombre de molécules comme l'halopéridol, un antagoniste dopaminergique (Sanberg, 1980), ou de toxines ont déjà été utilisées pour reproduire la symptomatologie parkinsonienne chez l'animal. Parmi les neurotoxines, le 6-OHDA (Simola et al., 2007; Ungerstedt, 1968; Ungerstedt et al., 1974), le MPTP (Burns et al., 1983), la rotenone (Betarbet et al., 2000), le paraquat (Ascherio et al., 2006; Costello, Cockburn, Bronstein, Zhang, & Ritz, 2009; J. S. Mandel et al., 2012; McCormack et al., 2002), le maneb (Costello et al., 2009; Thiruchelvam, Brockel, Richfield, Baggs, & Cory-Slechta, 2000) ou encore le trichloroéthylène (Gash et al., 2008) ont été et sont encore largement utilisées. A noter que selon les neurotoxines considérées, celles-ci apparaissent plus ou moins spécifiques des cellules dopaminergiques de la voie nigrostriée.

Parmi ces toxines, les deux les plus utilisées sont le 6-OHDA et le MPTP même s'il existe une tendance récente à explorer d'autres types de toxines (**Figure 17**).

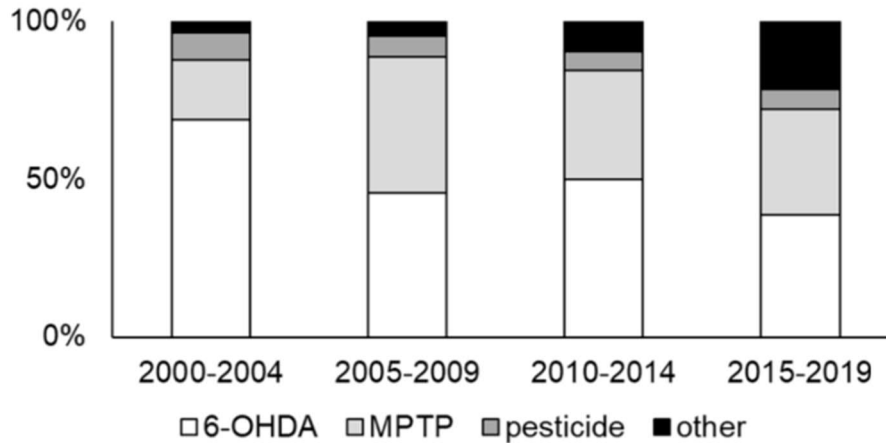


Figure 17 : Pourcentage d'articles utilisant soit le 6-OHDA, soit le MPTP, soit des pesticides soit d'autres toxines pour engendrer un modèle animal de la MP entre 2000 et 2019. D'après (Kin et al., 2019).

5.1.1. Les pesticides et herbicides

Comme évoqué précédemment, l'exposition aux pesticides ou aux herbicides est un facteur de risque de la MP et des nombreux laboratoires les ont utilisés pour générer des modèles animaux. Les pesticides les plus utilisés sont le paraquat (qui ressemble structurellement au MPTP) et la roténone.

La roténone peut traverser la BHE et pénétrer directement dans les neurones dopaminergiques grâce à son caractère lipophile. Une fois dans le neurone, la roténone bloque le complexe I mitochondrial créant du stress oxydatif et une mort cellulaire. Cela engendre une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire, une pathologie alpha-synucléine (présence d'inclusions ubiquitine et alpha-synucléine) ainsi que des symptômes moteurs chez les modèles rongeurs (Betarbet et al., 2000). Toutefois, on note une très grande variabilité interindividuelle, avec des animaux plus ou moins touchés. De plus, la roténone est toxique pour d'autres neurones que les neurones dopaminergiques et engendre un fort taux de mortalité chez les animaux traités. Le manque de reproductibilité, sa grande toxicité et son manque de spécificité font que la roténone est maintenant peu utilisée.

Le paraquat pénètre dans le cerveau via un système de transport facilité amino acide dépendant (Shimizu et al., 2001). Par la suite, il entre dans les neurones via un transporteur sodium dépendent. Une fois dans le neurone il altère le système antioxydant et a une activité pro apoptotique créant du stress oxydatif et une mort cellulaire. L'injection chez la souris a démontré que contrairement à la roténone, le paraquat est sélectif des neurones dopaminergiques mais que la perte neuronale est moins forte (entre 20 et 30%) ce qui engendre peu de symptômes moteurs (Betarbet et al., 2000). Une agrégation d'alpha-synucléine a été observée (Manning-Bog et al., 2002) mais vu son manque de sévérité le paraquat est peu utilisé.

5.1.2. La 6-OHDA

La 6-OHDA est la 1^{ère} neurotoxine à avoir été utilisée pour générer un modèle de MP chez l'animal en 1973 (Ungerstedt et al., 1974). La 6-OHDA est un analogue hydroxylé de la dopamine qui ne passe pas la barrière hémato encéphalique et doit donc être injecté dans le cerveau directement. Il entre dans les neurones dopaminergiques via les récepteurs DAT pour lesquels il a une forte affinité. Une fois dans les neurones il peut soit s'accumuler dans la mitochondrie au sein de laquelle il inhibe le complexe I, soit, rester dans le cytosol au sein duquel il fait l'objet d'une auto-oxydation, produisant un stress oxydatif et la mort cellulaire. La 6-OHDA permet d'obtenir à la fois une forte perte de cellules nigrales, une forte déplétion en dopamine au niveau du striatum (90 à 100%), et de ce fait des symptômes moteurs sévères (Thiele, Warre, & Nash, 2012). Selon le modèle choisi, l'injection intracérébrale de la toxine peut se faire dans un seul hémisphère ce qui permet de garder l'hémisphère controlatéral comme contrôle et d'éviter une trop forte mortalité. L'injection de 6-OHDA au niveau de la SN ou du faisceau médian du mésencéphale (MFB, principale voie de sortie des afférences dopaminergiques nigrostriées) ne permet pas de reproduire la lente et progressive dégénérescence des neurones dopaminergiques observée dans la MP puisqu'elles induisent une mort neuronale dès 12h après l'injection, les premiers symptômes moteurs apparaissant après 2 ou 3 jours. D'autres modèles ont ainsi été proposés par injection intrastriatale. Dans ces derniers cas, et selon le nombre et la localisation de ces injections, les pertes neuronales observées dans la SN peuvent être partielles ou plus sévères, les symptômes apparaissant après 4 à 6 semaines (Sauer & Oertel, 1994).

5.1.3. Le MPTP

Le MPTP est la seconde neurotoxine la plus utilisée pour générer un modèle de MP chez l'animal. Le mode d'action de cette molécule et les modèles animaux qui lui sont associés, plus particulièrement le modèle MPTP primate, seront abordés dans la Partie I de ce manuscrit.

Globalement, les modèles induits par neurotoxines sont des modèles sévères mimant des stades avancés de la maladie avec des symptômes moteurs robustes. Ces modèles restent les plus adaptés pour l'évaluation de thérapies symptomatiques. En revanche, il y a peu de pathologie alpha-synucléine chez ces modèles, ce qui est une deuxième caractéristique primordiale de la maladie de Parkinson. C'est pour cette raison que d'autres modèles ont été développés par la suite.

5.2. Les modèles induits par modification génétique

Les avancées dans la génétique ont aidé à développer des nouveaux modèles de la maladie, en particulier chez la souris. Plusieurs stratégies sont possibles :

- Surexpression de certaines protéines impliquées dans des formes génétiques de la MP, pour un gain de fonction.
- Knock out de certaines protéines pour une perte de fonction.

Parmi les modèles génétiques de surexpression, le plus étudié est la souris transgénique surexprimant l'alpha-synucléine sous ses formes WT, tronquée ou mutantes A53T ou A30P. Il a été observé chez les

souris surexprimant l' α -syn WT une faible pathologie α -syn et dégénérescence dopaminergique, entraînant une légère réduction de la dopamine au niveau striatal et quelques symptômes moteurs et non-moteurs légers. La dégénérescence dopaminergique est plus marquée chez les modèles surexprimant la forme tronquée ou mutée de l' α -syn mais reste limitée à environ 50% de perte neuronale dans la SN (Chesselet, 2008; Hansen et al., 2013; Kuo et al., 2010; Lam et al., 2011; McDowell, Shin, Roos, & Chesselet, 2014; Rockenstein et al., 2002). Une dégénérescence dopaminergique similaire (40%) a été observée chez des souris transgéniques surexprimant la forme mutante Q311X de Parkin (Lu et al., 2009). En revanche, les souris transgéniques surexprimant la forme mutante G2019S de LRRK2 (X. Li et al., 2010) et G309D de PINK1 (Gispert et al., 2009) ne montre pas de dégénérescence des cellules dopaminergiques.

Un modèle de surexpression de l'alpha-synucléine A53T a également été généré chez le primate (Niu et al., 2015). Ils n'ont pas observé de pathologie liée à l'alpha-synucléine ni de déficits moteurs mais en revanche ils ont observé des déficits cognitifs et des comportements anxieux chez ces animaux.

Des modèles KO ont aussi été générés comme les souris KO LRRK2 et KO Parkin qui sont viables mais ne montrent pas d'anomalies notables (Hinkle et al., 2012; F. A. Perez & Palmiter, 2005). Les souris KO PINK1 et KO DJ-1 montrent quelques déficits moteurs et non-moteurs mais pas de perte de neurones dopaminergiques alors que c'est le cas chez les rats KO DJ-1 (Dave et al., 2014; Glasl et al., 2012; Goldberg et al., 2005).

Ces modèles sont intéressants pour étudier la pathologie alpha-synucléine mais aussi et surtout pour évaluer de nouvelles thérapies et biomarqueurs ciblant l'alpha-synucléine. En revanche ils n'induisent pas assez de mort neuronale pour engendrer des symptômes robustes et quand ils en induisent cela n'est visible que chez des animaux âgés (16 mois). De plus, l'expression des protéines n'est pas physiologique et des potentiels mécanismes de compensation peuvent se mettre en place.

Afin de résoudre ce manque de toxicité, il y a des modèles combinant modification génétique et utilisation de toxines qui ont été récemment générés, comme ceux combinant l'injection de MPTP dans un modèle de souris transgénique DJ-1 KO (Kim et al., 2005). Ces modèles permettent de travailler sur la « dual hit hypothesis » d'interaction entre une prédisposition génétique et un facteur environnemental déclenchant.

La transgénèse n'est pas la seule stratégie déployée pour obtenir une surexpression de l'alpha-synucléine. En effet, il est possible de passer par l'utilisation des vecteurs viraux ou bien l'injection directe intracérébrale de cette protéines mutées ou agrégées. Ces deux stratégies seront abordées en détails dans la partie III de ce manuscrit.

OBJECTIF

La maladie de Parkinson est caractérisée par des troubles moteurs, cognitifs, psychiatriques et autonomiques liés à 1) la perte de dopamine engendrée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire et leurs innervations dans le striatum ; 2) L'accumulation progressive de la protéine alpha-synucléine dans des corps de Lewy. La neurotoxine MPTP permet de modéliser la mort neuronale dopaminergique, caractéristique de la maladie de Parkinson, chez l'animal y compris chez le primate non-humain. Ce modèle permet ainsi de fidèlement reproduire les symptômes moteurs de la MP et est souvent utilisé dans l'évaluation préclinique de nouvelles thérapies. La plupart des études précliniques chez le primate non-humain se focalisent sur l'amélioration du comportement moteur. Pourtant quelques publications ont décrit des symptômes non-moteurs tels que les déficits d'attention, de mémoire spatiale à court terme, de flexibilité cognitive, d'impulsivité, ainsi que des altérations du cycle activité/repos dans des modèles très précoces de la maladie (asymptomatiques ou peu symptomatiques). Afin d'utiliser les NMS de façon plus prédictive, il serait nécessaire d'explorer si ces symptômes sont présents dans un modèle MPTP sévère qui est plus pertinent par rapport au stade d'avancement de la maladie chez le patient au moment de l'administration de traitements symptomatiques. Le premier objectif de mon travail de thèse était donc **d'élaborer, mettre en œuvre et valider des outils permettant l'exploration de déficits fonctionnels non-moteurs dans un modèle primate MPTP sévèrement symptomatique**. Les expériences de comportement cognitif ont été délivrées sur écran tactile chez des primates sains à baseline pour vérifier leur capacité à exécuter la batterie et la valider. Ensuite les mêmes tâches ont été administrées après intoxication aigue au MPTP sur des primates sévèrement symptomatiques. Le suivi de la température corporelle a été assurée par un système de puce implantée pour relever des informations toutes les 15 minutes de façon totalement non invasive. Ces expériences ont permis de valider la présence de déficits sur les NMS pour la première fois dans un modèle sévère de MP chez le primate. L'impact de ces résultats est que ces biomarqueurs peuvent donc se révéler très utiles pour mesurer l'effet potentiel de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le deuxième objectif de ma thèse était ainsi d'évaluer l'effet d'une nouvelle stratégie de thérapie génique dans ce modèle primate de la MP et par la même occasion de valider l'utilisation de ces outils pour mettre en évidence une potentielle efficacité thérapeutique. Cette thérapie génique à visée symptomatique avait pour but de réguler la surexpression des trois enzymes nécessaires à la biosynthèse de la dopamine dans le striatum du primate MPTP afin de pouvoir contrôler le niveau d'expression des transgènes et donc la production de dopamine.

Cette étude est la première à démontrer la sécurité et l'efficacité préclinique d'une thérapie génique régulable chez le primate non-humain et la première à valider des biomarqueurs des NMS pour le suivi du traitement dans ce modèle. Les thérapies géniques actuellement en essai clinique dans le cadre de la MP sont toutes constitutives. La perspective de pouvoir développer des thérapies géniques régulables représente une alternative intéressante aux thérapies géniques constitutives permettant de moduler les taux de dopamine selon le besoin du patient et d'accroître la sûreté de l'approche en cas d'effet indésirable.

Un autre versant thérapeutique intéressant se focalise sur le rôle de l'alpha-synucléine dans la progression pathologique de la MP et sa modulation comme potentielle « disease modifying strategy». Or, le modèle primate MPTP de la MP ne développent quasiment pas de pathologie α -syn et n'est donc pas adapté à ce type d'études. Le troisième objectif de ma thèse était donc de **développer, caractériser et valider un nouveau modèle de synucléinopathie chez le primate non-humain**. Ce modèle est généré par l'inoculation de souches fibrillaires d'alpha-synucléine dans le striatum de primates. Les outils développés au cours de cette thèse, ainsi que l'imagerie et l'analyse post-mortem, seront utilisés pour évaluer la présence de symptômes moteurs et non-moteurs dans ce modèle.

L'objectif globale de ces travaux de thèse est d'améliorer l'évaluation préclinique de nouveaux modèles et de nouvelles stratégies thérapeutiques contre la maladie de Parkinson chez le primate non-humain, pour augmenter le caractère prédictif de nos résultats et leur translation en clinique.

**PARTIE I : CARACTERISATION DES
SYMPTOMES NON-MOTEURS DU
MODELE MPTP CHEZ LE PRIMATE NON-
HUMAIN**

1. Contexte

1.1. Le mécanisme du MPTP

Dans les années 80, des symptômes sévères de la maladie de Parkinson tels que la bradykinésie et la rigidité ont été observés chez un groupe d'addictes à l'héroïne. Ces personnes, jeunes, étaient non seulement répondeuses aux thérapies à base de L-DOPA mais développaient aussi des effets secondaires tels que les LIDs. En analysant l'héroïne synthétique qu'ils consommaient, une contamination par la neurotoxine MPTP a été identifiée (Langston, Ballard, Tetrud, & Irwin, 1983). L'analyse post-mortem des cerveaux de ces sujets confirma qu'ils présentaient une perte neuronale au niveau du mésencéphale ventral et une déplétion en dopamine au niveau du striatum (Langston, 1990). C'est ainsi qu'un lien entre MPTP et maladie de Parkinson fut établi. De études ultérieures ont permis de montrer que le MPTP lui-même n'est pas toxique pour les neurones dopaminergiques et se comporte comme une pro-toxine. Lipophile, le MPTP peut passer la BHE. Une fois dans le cerveau, le MPTP est métabolisé en MPDP⁺ par les MAO-B présentes au niveau des astrocytes et des neurones sérotoninergiques puis oxydé en 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) qui est lui toxique pour les neurones dopaminergiques (Brooks, Jarvis, & Wagner, 1989; Langston et al., 1983). En effet, le MPP⁺ possède une affinité pour le transporteur dopaminergique membranaire (DAT) ce qui explique sa pénétration préférentielle dans les neurones dopaminergiques (R. S. Shen, Abell, Gessner, & Brossi, 1985) (**Figure 18**).

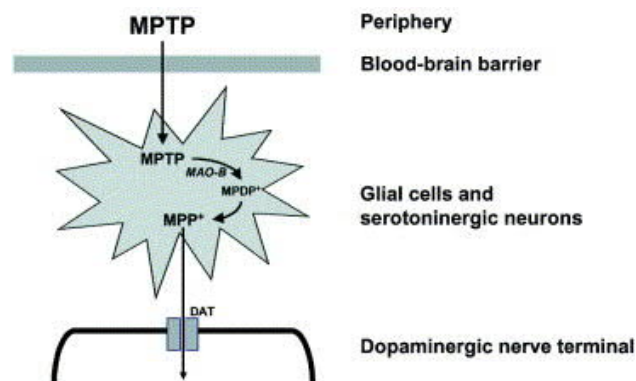


Figure 18 : Mécanisme d'action du MPTP et ses dérivés pour entrer dans les neurones dopaminergiques. D'après (Przedborski & Jackson-Lewis, 1998).

Une fois dans le neurone dopaminergique, le MPP⁺ s'accumule au niveau des mitochondries et inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale ce qui induit notamment une déplétion en ATP, du stress oxydatif et une mort cellulaire (Ramsay, Salach, & Singer, 1986) (**Figure 19**). Une partie du MPP⁺ ne va pas se fixer aux mitochondries mais va se fixer au transporteur vésiculaire des monoamines 2 (VMAT-2) et être internalisé dans les vésicules, ce qui constitue un mécanisme de protection (Y. Liu et al., 1992). Comme lors de la maladie de Parkinson les neurones dopaminergiques de la VTA sont moins touchés que ceux de la substance noire alors qu'ils portent aussi des récepteurs DAT. Cette différence pourrait être expliquée par une différence d'affinité (Blanchard et al., 1994) ou encore par la présence de calbindin dans les neurones de la VTA jouant un rôle protecteur (Lavoie & Parent, 1991). Les systèmes

sérotoninergiques et noradrénergiques sont aussi peu atteints alors que le MPP⁺ peut se fixer à leurs transporteurs. Cela serait également dû à une différence d'affinité (Burns et al., 1983; M. Gupta, Felten, & Gash, 1984; Namura et al., 1987).

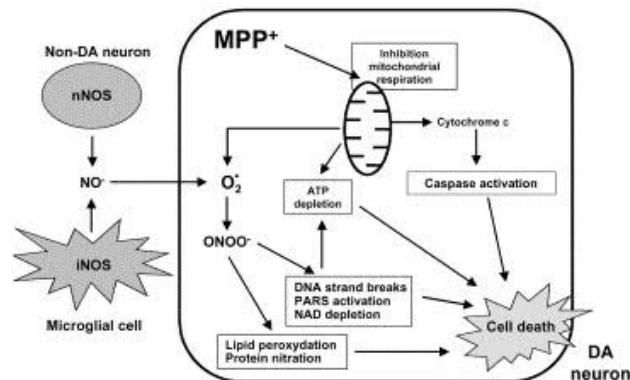


Figure 19 : Mécanisme d'action du MPP⁺ dans les neurones dopaminergiques pour induire une mort neuronale. D'après (Przedborski & Jackson-Lewis, 1998).

De nombreuses espèces animales ont été utilisées pour générer des modèles MPTP telles que la souris, le rat, le poisson zèbre, le nématode ou encore le primate non-humain. Parmi toutes ces espèces les rongeurs, et en particulier les rats, s'avèrent plus résistants au MPTP (Riachi, Dietrich, & Harik, 1990). En effet, le rat possède un fort taux de MAO-B au niveau de la BHE et le MPTP est donc converti en MPP⁺ au niveau périphérique, empêchant la traversée de la BHE (Schmidt & Ferger, 2001). Pour générer un modèle MPTP chez le rat, il faut donc réaliser des injections intracérébrales de MPP⁺. Le primate MPTP est lui considéré comme le « gold standard » des modèles animaux de la maladie de Parkinson car il s'avère très sensible à cette toxine et l'atteinte dopaminergique produite récapitule les principaux symptômes moteurs observés chez les patients.

1.2. Le modèle primate MPTP

Le MPTP a été utilisé chez un très grand nombre d'espèces de primates non-humains comme le macaque rhésus ou le macaque cynomolgus (Burns et al., 1983), le marmoset (Jenner et al., 1984), le saïmiri (Langston, Langston, & Irwin, 1984), le vervet vert (Taylor, Elsworth, Roth, Sladek, & Redmond, 1990) ou encore le babouin (Brouillet & Hantraye, 1995).

D'un point de vue physiopathologique, le MPTP induit chez le singe des déficits semblables à ceux observés lors de la maladie de Parkinson (inhibition du complexe I mitochondrial, une neurodégénérescence des neurones dopaminergiques au sein du mésencéphale ventral ainsi qu'une forte déplétion dopaminergique au sein du striatum (Langston et al., 1984). Comme lors de la maladie de Parkinson, les neurones dopaminergiques de la VTA sont moins atteints (Jacobowitz, Burns, Chiueh, & Kopin, 1984). De plus, la déplétion en dopamine au niveau du striatum suit les mêmes gradients que dans la MP (Bezard, Imbert, Deloire, Bioulac, & Gross, 1997; Y. Liu et al., 2014). Des études par microdialyse et histologiques ont ainsi démontré que le primate MPTP présente une réduction des niveaux de dopamine et de ses métabolites (DOPAC et HVA) plus élevée au niveau du striatum sensorimoteur qu'au niveau du striatum associatif et limbique (Boulet et al., 2008). En effet, dans des modèles

sévères chez le macaque, la perte du marquage TH au niveau du striatum sensori-moteur atteint -98,8% par rapport à la partie associative (-97,2%) ou limbique (-38,5%) (Jan et al., 2003).

D'un point de vue symptomatologique, les primates intoxiqués au MPTP développent des symptômes moteurs extrêmement similaires à ceux des patients parkinsoniens comme la rigidité, la bradykinésie, l'akinésie, le tremblement, l'instabilité posturale ou encore le « freezing » (Bezard et al., 2001; Burns et al., 1983; Hantraye et al., 1993). Ces symptômes peuvent être corrigés, comme chez le patient, par des traitements à base de L-DOPA de façon dose dépendante (Kurlan, Kim, & Gash, 1991). Les primates sous traitement dopaminergique de longue durée développent également des effets secondaires comme les LIDs (Aubert et al., 2005; Guigoni et al., 2005; Porrás, Li, & Bezard, 2012).

En plus de symptômes moteurs, les primates MPTP peuvent aussi développer des symptômes non-moteurs semblables à ceux des patients parkinsoniens. Ces symptômes peuvent être d'ordre cognitif tels que des déficits d'attention, de flexibilité cognitive, d'impulsivité, de planification ou de résolution de problème (Decamp & Schneider, 2004; Roeltgen & Schneider, 1991, 1994; Schneider, 2006; Schneider & Kovelowski, 1990; Schneider, Pioli, Jianzhong, Li, & Bezard, 2013; Schneider & Pope-Coleman, 1995; Schneider & Roeltgen, 1993; Schneider, Unguez, Yuwiler, Berg, & Markham, 1988). Ils peuvent aussi être d'ordre autonomiques tels que des altérations du sommeil avec une diminution du sommeil paradoxal, des épisodes d'éveil pendant la nuit et un excès de sommeil durant la journée (Almirall, Bautista, Sanchez-Bahillo, & Trinidad-Herrero, 2001; Barraud et al., 2009; Vezoli et al., 2011) ou d'ordre psychiatrique tels que les comportements apathiques (Fox et al., 2010). L'effet de la L-DOPA sur les symptômes non-moteurs est moins clair et pourrait être délétère selon les doses administrées (Schneider et al., 2013). Les NMS sont cependant moins documentés que les symptômes moteurs chez le primate. Une description plus détaillée est incluse dans le prochain sous chapitre.

Afin d'induire un syndrome parkinsonien chez le primate il est possible de suivre plusieurs types de régimes d'intoxication qui donnent lieu à différents types d'altérations dopaminergiques et donc de phénotypes. Les deux principaux types d'intoxication au MPTP sont l'intoxication chronique à faible dose ou aigue à forte dose.

Une intoxication chronique avec des injections de faibles doses de MPTP répétées sur une période longue permet d'obtenir une atteinte progressive de la voie nigrostriée. Le putamen moteur post-commissural est alors le plus fortement et précocement touché puis les régions plus ventrales sont également atteintes. Cette dégénérescence est étendue et touche aussi d'autres voies, non-dopaminergiques (Forno, DeLanney, Irwin, & Langston, 1993; Masilamoni & Smith, 2018; Masilamoni, Weinkle, Papa, & Smith, 2021; Pérez-Otaño et al., 1994). Cela induit une symptomatologie assez faible mimant des stades prodromaux ou assez précoces de la maladie.

Au contraire, une intoxication aigue avec des injections de fortes doses de MPTP sur une période courte permet d'obtenir une forte atteinte, non progressive, de l'axe nigrostrié. Dans ce cas, l'atteinte se limite à la voie dopaminergique (Forno et al., 1993; Masilamoni & Smith, 2017; Pérez-Otaño et al., 1994). La symptomatologie est très marquée mimant des stades avancés ou très avancés de la maladie. Les injections de MPTP se font le plus souvent en intramusculaire (IM) mais elles peuvent également se faire en intraveineux (IV), notamment pour les modèles aigus. Il est aussi possible d'engendrer des modèles héli-parkinsoniens en injectant le MPTP dans une artère carotide. Cela a pour avantage de garder l'hémisphère controlatéral comme contrôle et de générer un phénotype plus léger.

Le fait de pouvoir adapter le régime d'intoxication selon le type de modèle que l'on désire est un gros avantage de l'utilisation du MPTP. Ainsi, il est possible de privilégier un modèle précoce de la maladie pour évaluer un traitement préventif de la MP. Au contraire, on va privilégier un modèle plus sévère pour évaluer un traitement symptomatologique de la MP. Dans certaines études, deux méthodes d'intoxication ont été utilisées afin de générer deux modèles MPTP : un modèle sévère pour l'évaluation de l'effet d'une thérapie sur les LIDs et un modèle chronique à faible dose pour pouvoir tester les effets sur les symptômes cognitifs prodromaux (Ko et al., 2016).

Les effets physiologiques et phénotypiques du MPTP sur le primate sont reproductibles mais différent entre les individus selon leur vulnérabilité au MPTP, comme chez l'homme (Mounayar et al., 2007; Taylor et al., 1990; Vezoli et al., 2011). Ces différences peuvent s'expliquer par une susceptibilité génétique différente entre les individus. L'âge a aussi été évoqué comme facteur de susceptibilité (Ovadia, Zhang, & Gash, 1995; Z. Zhang et al., 2000). Durant ce processus d'intoxication, il arrive d'observer des phénomènes de récupération spontanée. En effet, des primates qui ont été intoxiqués au MPTP et qui présentaient des symptômes parkinsoniens sévères, peuvent présenter une amélioration spontanée de leurs symptômes, ce qui n'est pas le cas chez le patient parkinsonien. Cela est dû à la mise en place de mécanismes compensatoires, qui augmentent la sécrétion de dopamine et son renouvellement (Bubak et al., 2015; Eidelberg, Brooks, Morgan, Walden, & Kokemoor, 1986; Elsworth et al., 2000). Ces mécanismes compensatoires ne sont pas dus à l'intervention du système dopaminergique uniquement mais aussi au système sérotoninergique. En effet, alors que le nombre de fibres sérotoninergiques striatales est diminué chez les primates parkinsoniens MPTP, une augmentation de leur nombre a été observée lors de la récupération motrice spontanée (Bezard, Gross, & Brotchie, 2003; Mounayar et al., 2007). Schématiquement, tant que la perte de neurones dopaminergiques de la SN n'a pas atteint un certain niveau, la déplétion en dopamine au niveau du striatum peut être compensée par une augmentation de la synthèse de la dopamine par les cellules restantes. Quand la perte neuronale devient plus prononcée alors le métabolisme de la dopamine est modifié, relayé par d'autres systèmes comme le système sérotoninergique. Ces mécanismes compensatoires sont efficaces jusqu'à ce que la dégénérescence dopaminergique neuronale soit trop forte. Il faut donc adapter le régime d'intoxication à chaque individu pour aboutir à une atteinte symptomatologique homogène.

Le modèle primate MPTP reproduit un grand nombre de caractéristiques de la maladie de Parkinson, mais comme tous les modèles, il montre des limites. Par exemple, ce modèle présente peu de pathologie alpha-synucléine. En effet, il a été observé qu'après une intoxication au MPTP, les primates présentent des taux d'alpha-synucléine augmentés et une légère accumulation et agrégation de celle-ci sans qu'il y ait formation de LB ou de LN (Huang et al., 2018; Kowall et al., 2000; Purisai, McCormack, Langston, Johnston, & Di Monte, 2005). L'hypothèse première était que les temps d'étude n'étaient pas assez longs pour observer la formation de LB. Cette hypothèse a été réfutée après l'observation de pathologie alpha-synucléine mais pas de LB chez des primates MPTP intoxiqués depuis 10 ans (G. Halliday et al., 2009). Le modèle MPTP n'est donc pas particulièrement adapté pour l'étude des mécanismes physiopathologiques, des traitements ou des biomarqueurs liés à la pathologie alpha-synucléine.

En revanche, le modèle MPTP s'avère particulièrement adapté pour l'étude de mécanismes physiologiques, de biomarqueurs ou de traitements liés à la dégénérescence dopaminergique et la perte de dopamine dans le striatum et notamment dans l'évaluation de thérapies à visée symptomatique. Dans ce sens, les symptômes moteurs du primate MPTP ont été les premiers à être caractérisés. Avec une

demande clinique plus importante visant à traiter les symptômes non-moteurs de la MP, de plus en plus d'études se sont attachées à caractériser les NMS présents dans ce modèle primate.

1.3. L'étude des symptômes non-moteurs chez le primate MPTP

1.3.1. L'étude des déficits cognitifs

Chez les patients parkinsoniens les troubles comportementaux (dont les symptômes non-moteurs), sont principalement évalués en utilisant des échelles cliniques. L'échelle clinique la plus utilisée est l'UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) développée en 1980. Cette échelle de 50 questions est divisée en 4 parties : les expériences non-motrices de la vie de tous les jours, les expériences motrices de la vie de tous les jours, l'examen moteur et les complications motrices. La première partie de cette échelle évalue donc l'altération cognitive, les hallucinations et psychose, l'humeur dépressive, l'état anxieux, l'apathie et les signes de syndrome de dérégulation dopaminergique (comportements compulsifs). En plus des échelles cliniques, certains tests cognitifs peuvent également être utilisés. Un exemple est le Mini Mental Parkinson qui évalue un grand nombre de tâches cognitives comme l'orientation, l'enregistrement visuel, le contrôle mental, le rappel visuel, la fluence croisée ou la flexibilité cognitive. Ce test permet de distinguer les patients en trois groupes : ceux sans troubles cognitifs, ceux avec des troubles légers à modérés et ceux présentant une démence (Caslake et al., 2013). Au contraire, d'autres tests se concentrent sur une seule tâche comme le test de Stroop qui évalue l'attention sélective c'est-à-dire la capacité à sélectionner des informations pertinentes parmi des distracteurs (Kleiner et al., 2018).

Les échelles cliniques et les tests cognitifs ne sont pas transposables tels quels aux primates. Toute la difficulté de l'évaluation des NMS chez le primate parkinsonien réside donc dans le développement et l'adaptation au singe des tests utilisés en clinique. L'étude des déficits cognitifs chez le primate MPTP a débuté dans les années 90, principalement menée par l'équipe de Jay Schneider.

L'une des premières tâches cognitives évaluée chez le primate MPTP fut la discrimination visuelle qui permet d'identifier des atteintes du cortex inféro-temporal. Dans ce test, le primate doit différencier deux symboles, un signe plus et un signe moins, sur des plaques de plexiglas. Seul le signe plus est associé à une récompense. Les performances avant et après intoxication au MPTP sont restées intactes chez les macaques asymptomatiques intoxiqués par de faibles doses de MPTP (Schneider, Giardiniera, & Morain, 2002; Schneider & Kovelowski, 1990; Schneider & Pope-Coleman, 1995; Schneider & Roeltgen, 1993; Schneider, Tinker, Van Velson, Menzaghi, & Lloyd, 1999). Cela était attendu puisque cette tâche ne dépend pas de l'axe fronto-striatal.

La tâche cognitive la plus utilisée pour évaluer les déficits cognitifs des primates MPTP a été l'ORDT (object retrieval detour task). Cette tâche permet d'évaluer trois fonctions dépendantes de l'axe fronto-striatal : l'attention, la mémoire de travail et l'inhibition de la tendance naturelle à aller rechercher directement une récompense (prepotent response tendency). Le principe du test repose sur l'utilisation d'une récompense placée dans une boîte transparente afin qu'elle soit visible pour l'animal (**Figure 20**). Une seule ouverture permet d'accéder à la récompense et cette ouverture est placée directement face à

l'animal 1/3 du temps et sur un côté (droit ou gauche) les 2/3 du temps. Le primate doit donc inhiber son envie d'aller directement chercher la récompense, regarder de quel côté est placée l'ouverture et faire un détour avec sa main pour pouvoir y accéder. Il dispose d'une minute pour réaliser la tâche. Toutes les équipes ayant utilisé ce test sur des singes avant et après intoxication au MPTP (chronique à faible dose) ont observé que les singes parkinsoniens sont plus lents à réaliser la tâche, ce qui est attendu au vu de leurs symptômes moteurs. Mais surtout ils font plus d'erreurs persévératives, ce qui traduit l'existence d'un syndrome frontal (Choudhury & Daadi, 2018; Pessiglione et al., 2003; Pessiglione, Guehl, Hirsch, Feger, & Tremblay, 2004; Schneider & Pope-Coleman, 1995; Taylor et al., 1990; Vezoli et al., 2011). Ce test a été très utilisé car il est simple à apprendre et facile à mettre en place.



Figure 20 : Exemple d'un marmouset réalisant un ORDT. D'après (Choudhury & Daadi, 2018).

D'autres tests, aussi dépendants de l'intégrité de l'axe fronto-striatal, visent à évaluer la flexibilité cognitive chez le primate MPTP. C'est le cas du CSST (Conceptual Set Sorting Test) qui est une adaptation du test WCST (Wisconsin Card Sorting Test) utilisé chez l'homme. Le principe de ce test repose sur l'idée que le primate doit choisir entre deux items, de forme et de couleur différentes, dont un est récompensé. Le singe doit trouver la règle par essai et erreur. Une fois qu'il a identifié une stratégie gagnante (par ex la forme), la règle change et c'est l'autre dimension (la couleur) qui est récompensée. Le primate doit donc adapter sa réponse en élaborant une nouvelle règle afin d'obtenir sa récompense. Dans ce test, les primates MPTP (chronique à faible dose) font plus d'erreurs persévératives qu'avant intoxication et ont besoin de plus d'essais pour élaborer la nouvelle règle (Decamp & Schneider, 2004). Le test IEDS (Intra-Extra-dimentional set shift task) est une variante plus complexe de ce test. Il est composé de 5 sous tests (**Figure 21**) : 1) discrimination visuelle simple et inversée 2) discrimination visuelle composée 3) discrimination visuelle composée et inversée 4) changement intra-dimensionnel et inversé 5) changement extra-dimensionnel et inversé. Les primates après intoxication au MPTP arrivent à passer toutes ces étapes mais il leur faut beaucoup plus d'essais que pour les singes sains, surtout pour l'étape de discrimination inversée et de changement extra-dimensionnel (Decamp & Schneider, 2004).

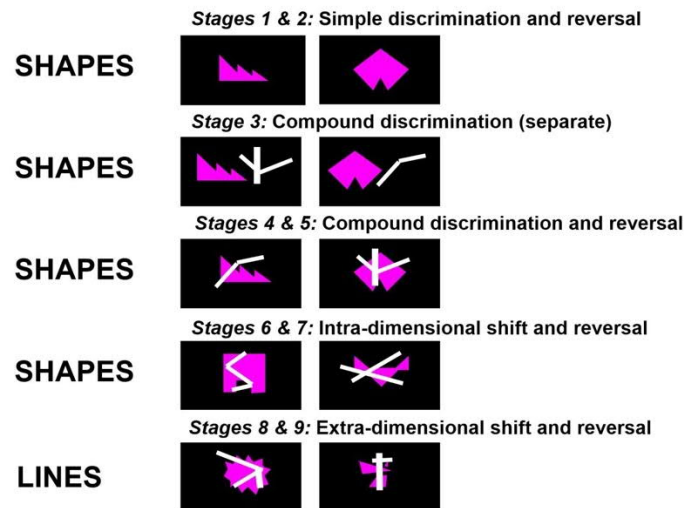


Figure 21 : Différentes étapes du test IEDS. D'après (Decamp & Schneider, 2004).

D'autres tâches ont également été utilisées pour explorer les déficits cognitifs des primates MPTP comme la VDR (Visual Delayed Response). Cette tâche permet d'évaluer la mémoire spatiale à court terme. Elle peut se présenter sous différentes versions. L'une d'entre elles consiste à présenter à l'individu pendant deux secondes deux puits dont l'un est récompensé. Un écran opaque est ensuite placé entre le primate et les puits et les puits sont recouverts. L'écran est ensuite enlevé au bout d'un délai de temps variable et le primate doit indiquer le puit récompensé. Les différentes études utilisant ce test chez le primate avant et après intoxication au MPTP (chronique à faible dose) ont observé que les singes parkinsoniens mettent plus de temps à choisir et sélectionner le bon puit mais surtout font plus d'erreurs. Ceci met en avant un déficit de mémoire spatiale et d'attention (Ko et al., 2016; Schneider et al., 1999). D'autres versions plus récentes ont été implémentées sur écrans tactiles. Dans ce cas, un cercle blanc servant d'indice apparaît d'un côté ou de l'autre de l'écran durant deux secondes. Après un certain délai (compris entre 2 et 60 secondes et distribué au hasard) ce cercle disparaît et deux cercles rouges apparaissent de chaque côté de l'écran. Le singe doit choisir le cercle rouge qui apparaît dans la même position que le cercle blanc/indice pour obtenir sa récompense (Fernandez-Ruiz, Doudet, & Aigner, 1995; Schneider et al., 2013; Slovin et al., 1999).

L'impulsivité des primates MPTP a aussi été testée par le test de « motor readiness » (Decamp & Schneider, 2004, 2006; Schneider, 2006). Dans cette tâche, le primate doit appuyer sur un levier durant un certain délai et attendre qu'une cible apparaisse sur l'écran. Il doit ensuite toucher cette cible pour obtenir une récompense. Les singes après intoxication au MPTP (chronique à faible dose) relâchent le levier prématurément plus souvent ce qui reflète une certaine impulsivité.

1.3.2. L'étude des symptômes psychiatriques

L'étude des symptômes psychiatriques chez le patient parkinsonien se fait le plus souvent en utilisant des échelles d'auto-évaluation, comme avec la LARS (Lille apathy rating scale) qui évalue l'apathie. L'apathie peut se mesurer comme la volonté d'atteindre un but (Levy & Dubois, 2006) et peut aussi être évaluée via l'utilisation d'un dynamomètre (Chong et al., 2018). Il a ainsi été démontré que les patients parkinsoniens choisissent de faire moins d'efforts que les témoins sains pour de faibles récompenses.

Cette réponse est modifiée par les traitements dopaminergiques ou les patients choisissent d'investir plus d'efforts pour une récompense donnée lorsqu'ils sont dans leur période ON par rapport à leur période OFF (Chong et al., 2015).

Chez le primate, une échelle similaire évaluant quatre types de comportement (agitation, hallucinations, toilettage obsessionnel et stéréotypies) a été utilisée (Fox et al., 2010). Appliquée au marmoset MPTP intoxiqué de façon aiguë et sous traitement L-DOPA, cette étude a démontré que les troubles du comportement sont présents dès le premier jour du traitement L-DOPA et ne sont pas dépendants de la durée de ce traitement.

A ma connaissance, deux équipes seulement ont étudié l'apathie chez le singe MPTP. Dans la première étude menée chez des singes hémi-parkinsoniens, les auteurs ont utilisé une échelle afin d'évaluer ce déficit. Deux tâches sont proposées au primate : 1) Quitter sa cage, aller dans un couloir adjacent et tourner en rond, le tout en étant guidé par un expérimentateur via une canne reliée à un collier de contention 2) Prendre un fruit avec l'une ou l'autre de ses mains en étant en chaise de contention. L'échelle permet de mesurer la résistance pour sortir de sa cage, commencer à marcher dans le couloir, faire des ronds et prendre la récompense en mesurant le degré et la fréquence de stimulation nécessaire pour motiver le primate à se déplacer. Il a été démontré que le degré d'apathie augmente avec la dose de MPTP injectée et qu'il est lié à l'altération dopaminergique dans le noyau accumbens et la VTA (analyses histologiques). L'apathie est aussi corrélée au comportement moteur et à l'altération dopaminergique dans la SN mais dans une moindre mesure (Brown et al., 2012; L. Tian et al., 2015).

Dans la deuxième étude, une tâche d'atteinte guidée visuellement a été administrée à des primates avant et après intoxication au MPTP. Le singe placé en chaise de contention doit appuyer sur un levier jusqu'à ce que l'un des trois boutons présentés devant lui s'allume. Pour obtenir une récompense, il doit alors lâcher le levier et appuyer sur le bouton illuminé avant que celui-ci ne s'éteigne. Les auteurs de l'étude ont observé que les singes MPTP, y compris à un stade asymptotique moteur réussissent les premiers essais puis s'arrêtent, ceci étant interprété comme un manque de motivation (Schneider et al., 1988).

Ces deux études présentent quelques limitations : Dans la première étude, l'échelle est très subjective et assez éloignée de celle utilisée en clinique ; dans la deuxième étude, la tâche cognitive n'est pas adaptée spécifiquement à l'étude de l'apathie, mais plutôt au temps de réaction. Ceci pourrait être lié à des troubles moteurs légers ou un déficit de mémoire de travail aussi bien qu'à un désintérêt de l'animal pour la tâche proposée.

1.3.3. L'étude des déficits autonomiques

Certains déficits autonomiques ont aussi été étudiés chez le primate MPTP ; c'est le cas des perturbations du cycle activité/repos. Chez les patients parkinsoniens, l'altération du rythme circadien et du sommeil est évalué par des échelles d'auto-évaluation mais peut également l'être par des analyses actigraphiques et des enregistrements électrophysiologiques qui demandent un séjour dans une clinique de sommeil (Morgenthaler et al., 2007).

Dans une première étude portant sur trois macaques MPTP (un singe asymptotique moteur et deux symptomatiques), des enregistrements EEG (électroencéphalogramme), EOG (électro-oculogramme) et EMG (électromyogramme) ont été réalisés pendant 8 nuits. La température sous-cutanée a été

enregistrée via un système de télémétrie radio. Les résultats montrent que les singes MPTP symptomatiques ont un sommeil plus léger, un sommeil paradoxal diminué et une température plus basse par rapport à l'animal asymptomatique (Almirall et al., 1999). Une autre étude des mêmes auteurs portant sur sept macaques MPTP (deux asymptomatiques, un peu symptomatique, deux modérément symptomatiques et deux sévèrement symptomatiques) a montré que les courbes de température et l'activité locomotrice, monitorées durant deux semaines avec un système de télémétrie, sont altérées et cette atteinte du rythme circadien est plus marquée pour les singes ayant le plus de symptômes (Almirall et al., 2001). Quelques années plus tard, l'évaluation des troubles activité/repos par surveillance EEG à long terme à l'aide d'un appareil de télémétrie a montré l'existence d'altérations du cycle circadien avant même l'apparition des symptômes moteurs. Plus précisément, les auteurs ont observé une perturbation marquée du cycle activité/repos avec une efficacité réduite du sommeil, une dérégulation du sommeil paradoxal et une augmentation de la somnolence diurne (Barraud et al., 2009) avec amélioration sous traitement L-DOPA (Belaid et al., 2014). Ceci a été confirmé dans une autre étude où cette fois l'activité des animaux a été analysée via des détecteurs infrarouges placés au-dessus de la cage (Vezoli et al., 2011). Dans cette étude, il a été observé une altération du rythme activité/repos et des déficits cognitifs dès la 1ère semaine d'intoxication alors que les symptômes moteurs n'étaient apparus qu'après 3-5 semaines. A noter que certains animaux ont présenté une récupération motrice au bout de 5-7 semaines. Chez ces primates, les déficits cognitifs (ORDT) et les altérations du cycle activité/repos restent malgré cela inchangés. Après traitement à la L-DOPA, on note une amélioration du comportement moteur et cognitif mais pas du cycle activité/repos. Enfin, il a été possible d'établir un lien entre perturbations du rythme circadien (réduction de l'amplitude et de la stabilité du cycle) et niveau de dégénérescence du système dopaminergique (Fifel et al., 2014).

Ces études montrent que le modèle primate MPTP, en plus de mimer fidèlement les symptômes moteurs de la MP, permet aussi de mimer un large spectre de symptômes non-moteurs cognitifs, psychiatriques et autonomiques. Cependant, la quasi-totalité des études portant sur l'exploration de ces symptômes chez le primate MPTP ont utilisé des régimes d'intoxication chroniques avec des faibles doses de MPTP, ce type d'intoxication conduisant à des modèles asymptomatiques ou peu symptomatiques d'un point de vue moteur.

2. Objectifs

Comme discuté précédemment, le modèle primate MPTP est très souvent utilisé dans les études précliniques évaluant des nouvelles thérapies pour la MP car ses symptômes moteurs sont très proches de ceux de la MP et les effets biologiques sont plus prédictifs. Dans une grande majorité des études cliniques et précliniques, l'accent est mis sur l'évaluation du comportement moteur. Pourtant, comme nous l'avons vu précédemment il a été démontré que certains NMS sont présents chez le primate MPTP, notamment des déficits attentionnels, des troubles de la mémoire spatiale à court terme, une diminution de la flexibilité cognitive, une plus grande impulsivité ou encore des altérations du cycle activité/repos. Cependant, la majorité de ces études ont utilisé des régimes d'intoxication utilisant des faibles doses chroniques de MPTP. Ce type d'intoxication conduit à des modèles parkinsoniens peu marqués caractérisés par un phénotype moteur asymptomatique ou peu symptomatique associé à une atteinte

modérée du système dopaminergique ce qui peut en limiter la pertinence clinique dans l'évaluation de traitements expérimentaux (comme la thérapie cellulaire ou la thérapie génique) s'adressant plutôt à des patients en phase avancée de la maladie.

Le but de notre étude a donc été de développer et de valider de nouveaux outils pour explorer les NMS dans un modèle primate d'intoxication au MPTP chronique sévère. Nous avons ainsi développé et testé une batterie de tests sur écran tactile afin d'évaluer un large spectre de déficits cognitifs et limbiques chez des singes parkinsoniens présentant des déficits moteurs. Nous avons également étudié les altérations du cycle activité/repos chez ces mêmes animaux, en utilisant le suivi de la température corporelle. En effet, la validation de ces outils nous est apparue primordiale avant de pouvoir les utiliser lors de l'évaluation de l'efficacité de nouvelles thérapies symptomatiques, autre sujet de ma thèse.

3. Protocole expérimental

Huit macaques ont été intoxiqués chroniquement au MPTP jusqu'à ce qu'ils développent des symptômes parkinsoniens sévères et stables. Leur comportement moteur (scores cliniques et locomotion spontanée) et leur comportement non moteur (tests cognitifs + suivi de la température) ont été évalués avant et après intoxication au MPTP (**Figure 22**). Une fois leurs déficits évalués, ces animaux ont ensuite pu intégrer des protocoles d'études évaluant l'efficacité de différentes stratégies de thérapie génique, que nous décrivons ultérieurement au chapitre II.

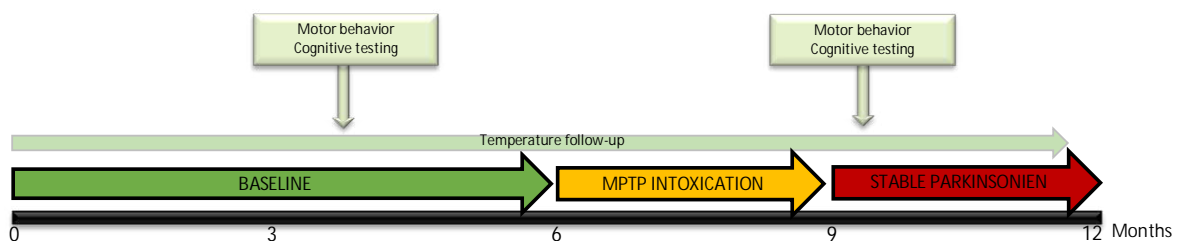


Figure 22 : Protocole expérimental de l'étude sur la caractérisation des symptômes non-moteurs du modèle MPTP chez le primate non-humain.

4. Matériel et méthodes

4.1. Sujets

Cette étude a été conduite en accord avec les réglementations européennes (Directive 2010/63) et en conformité avec les normes concernant l'utilisation d'animaux de laboratoire dans des établissements

autorisés (OLAW – n°#A5826-01). Durant toute la durée de l'étude les primates ont été hébergés dans des conditions environnementales contrôlées (cycle de lumière de 12 heures, température de 22 ± 1 °C et humidité de 50%). Tous les animaux ont eu un accès ad libitum à l'eau et n'ont pas été sujets à des restrictions alimentaires. Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique local n°44 et le Ministère de la Recherche et l'enseignement supérieur avant son commencement. Le maximum a été fait pour limiter la souffrance animale et les animaux ont été suivis par un vétérinaire et des techniciens formés à la manipulation et à l'hébergement de NHP.

4.2. Intoxication au MPTP

Huit macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) mâles adultes, provenant de l'île Maurice, d'âge moyen $5,56 \pm 0,35$ ans et de poids moyen $6,11 \pm 0,49$ kg ont ainsi été intoxiqués au MPTP dans cette étude. Des injections intramusculaires répétées de 0,2mg/kg ont été réalisées jusqu'à obtention de symptômes sévères et stables, selon les régimes d'injection indiqués dans le **tableau 3**, afin de s'adapter à chaque individu. Ces animaux ont été intoxiqués en deux groupes de quatre animaux suivant le protocole expérimental de l'étude à laquelle ils appartenaient.

Les primates sont jugés stablement parkinsoniens lorsque :

- leur activité motrice spontanée est diminuée d'au moins 80% par rapport à leur activité de base dans leur évaluation hebdomadaire et cela durant trois semaines de suite (l'évaluation motrice est décrite dans le prochain sous chapitre),
- leur score clinique est supérieur à 8 sur l'échelle de Papa et Chase (Papa & Chase, 1996) dans leur évaluation hebdomadaire (l'évaluation motrice est décrite dans le prochain sous chapitre).

Le poids des animaux a été contrôlé durant toute la phase d'intoxication. En accord avec le protocole éthique, si la perte de poids excédait les 15% par rapport au poids avant injection du MPTP alors l'intoxication devait être stoppée. Pour éviter une telle perte de poids, les animaux le nécessitant ont été assistés par un nourrissage quotidien. Le comportement moteur des animaux a continué à être évalué régulièrement (toutes les trois semaines) tout au long de l'étude afin de surveiller et empêcher l'apparition de toute récupération motrice spontanée.

Tableau 3 : Résumé des données de la phase d'intoxication au MPTP par PNH de l'étude sur la caractérisation des symptômes non-moteurs du modèle MPTP chez le primate non-humain.

Monkey ID	Doses (mg/kg)	Number of doses	Total dose (mg)	Total duration of intoxication phase (days)	Regimen
Mac 1	0,2	17	23,4	31	Every day the first week and then 2 to 3 times every week/10 days
Mac 2	0,2 or 0,25 or 0,5	28	36,96	31	Every day the first week and then 2 to 3 times every week/10 days
Mac 3	0,2	20	20,74	45	Every day the first week and then 2 to 3 times every week/10 days

Mac 4	0,2	15	15,36	31	Every day the first week and then 2 to 3 times every week/10 days
Mac 5	0,2 or 0,5	41	51,5	166	3 to 5 times the first two weeks and then 1 to 2 times every week
Mac 6	0,2 or 0,5	45	72,73	157	3 to 5 times the first two weeks and then 1 to 2 times every week
Mac 7	0,2 or 0,5	41	77,43	161	3 to 5 times the first two weeks and then 1 to 2 times every week
Mac 8	0,2 or 0,25 or 0,5	88	91,97	456	3 to 5 times the first two weeks and then 1 to 2 times every week

4.3. Évaluation du comportement moteur

L'évaluation de la sévérité des symptômes moteurs a été faite en utilisant des échelles cliniques. A MIRCen nous utilisons une version adaptée de l'échelle conçu par Papa et Chase et spécifiquement adaptée au primate parkinsonien (Badin et al., 2019; Jarraya et al., 2009; Papa & Chase, 1996). Le principe est de noter la présence ou l'absence de plusieurs symptômes moteurs selon leur intensité afin d'obtenir un score total compris entre 0, correspondant à « pas de symptômes » et 14 correspondant à « parkinsonisme très sévère » (**Tableau 4**). A l'état de base, le score clinique est évalué une fois, puis celui-ci est établi de façon quotidienne durant toute la phase d'intoxication, une fois par semaine durant la phase de stabilisation et une fois toutes les 3 semaines le reste du temps.

Tableau 4 : Échelle de score clinique adaptée de (Papa & Chase, 1996).

General mobility	Climbing	Tremor	Gait	Posture
0 = Normal	0 = Normal	0 = Absent	0 = Normal	0 = Normal
1 = Reduced	1 = Reduced	1 = Mild	1 = Slow	1 = Flexed
2 = Severe	2 = Difficult	2 = Severe	2 = Freezing	2 = Crouched
3 = Very reduced	3 = Unskilled			
4 = Unapparent	4 = Incapable			

En plus du score clinique, l'activité locomotrice spontanée est quantifiée par analyse vidéo. Les primates sont placés dans une cage vidéo dédiée et sont filmés durant 40 minutes en utilisant le logiciel Media Recorder® (Noldus). Les vidéos sont ensuite analysées grâce au logiciel Ethovision® (Noldus) qui permet d'extraire des images de nombreux paramètres, dont la distance totale parcourue par l'animal (TDM – Total Distance Moved) ou encore sa vitesse moyenne (**Figure 23**). La TDM et la vitesse moyenne sont calculées sur les 30 premières minutes de la vidéo. A baseline, les animaux sont filmés 8 fois : trois jours de suite pour que l'animal s'habitue à ce nouvel environnement puis cinq fois de suite pour quantifier son comportement moteur. L'activité locomotrice à baseline est calculée comme étant la moyenne des TDM des trois dernières vidéos. Durant la phase d'intoxication, les animaux sont filmés une fois par semaine et une fois toutes les trois semaines durant la phase de stabilisation. L'activité

locomotrice au stade parkinsonien stable est également calculée comme étant la moyenne des trois dernières vidéos d'un temps donné.

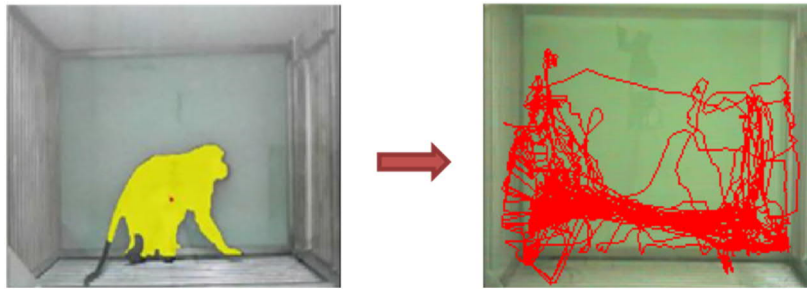


Figure 23 : Évaluation de l'activité locomotrice spontanée chez le primate via le logiciel Ethovision® (Noldus).

4.4. Évaluation du comportement cognitif

Une batterie de tests cognitifs et limbiques sur écran tactile a été développée au laboratoire. Le but était d'explorer chez le primate MPTP sévèrement symptomatique, différents types de tâches affectées chez le patient parkinsonien. Ces tâches sont associées à l'axe fronto-striatal et/ou striato- limbique et donc dépendantes de l'intégrité du système dopaminergique.

Ces tests sur écran tactile sont très peu contraignants pour les primates. En effet, les singes peuvent les réaliser librement dans leur pièce d'hébergement (pas de système de contention nécessaire), et sans restriction alimentaire ou hydrique. Les tests sont directement programmés au laboratoire (logiciel BUNTO). L'écran tactile (Elotouch, France) est relié à un système de récompense, lui aussi fabriqué au laboratoire, et qui libère des billes au goût fruité (Fruit Crunchies TM, Bio-Serv, USA).

Dans un premier temps, les primates doivent être familiarisés à l'utilisation des écrans tactiles. Pour cela un écran entièrement rempli par un carré blanc est placé devant leur cage d'hébergement. Il leur suffit de toucher l'écran pour recevoir une récompense. Cet entraînement commence le plus souvent en groupe social puis continue en cage individuelle. Une fois que les primates sont familiarisés à l'écran tactile et à la capacité d'obtenir une récompense quand ils touchent le carré blanc, les animaux sont placés dans une seconde phase au cours de laquelle ils doivent apprendre à toucher un carré blanc dont la taille se réduit graduellement (10 pixels x 10 pixels) afin d'acquérir de la précision dans leur geste. Cet entraînement peut durer quelques jours comme plusieurs mois. Certains primates n'atteignent jamais un niveau de performance acceptable et doivent être écartés de ce type d'étude. Seuls les animaux ayant un niveau satisfaisant sont ensuite soumis à la batterie de tests de l'étude. Sur quinze primates ayant passé l'entraînement à l'écran tactile, seuls huit ont réussi à compléter la batterie complète de tests cognitifs. Tous les tests commencent par la présentation d'un carré blanc que le primate doit toucher pour lancer un essai. Cela permet de confirmer que l'animal est volontaire et concentré. En général, les singes sont testés une heure par jour à baseline et deux fois 30 minutes après intoxication au MPTP afin de prendre en compte leur état de fatigue potentiel.

4.4.1. Test de discrimination visuelle

Le test de discrimination visuelle simple n'est que très rarement utilisé chez l'homme tel quel. En revanche, il constitue la première étape du WCST, utilisé chez le patient parkinsonien pour évaluer la flexibilité cognitive. Dans notre étude, il est utilisé comme un test permettant de de : 1) vérifier qu'à baseline les primates sont capables d'effectuer des tests cognitifs sur écran tactile, c'est-à-dire qu'ils distinguent les formes et les couleurs, qu'ils sont attentifs et volontaires et qu'ils ont une mémoire de travail normale et 2) vérifier que les primates MPTP, sévèrement symptomatiques, sont également capables d'effectuer le test malgré leurs symptômes moteurs.

Le singe doit choisir entre trois items de différentes formes et couleurs présentés l'un à côté de l'autre de façon randomisée (**Figure 24**). Un seul de ces items est récompensé. L'animal doit d'abord identifier l'objet qui est récompensé (en utilisant une stratégie d'essai erreur) puis le garder en mémoire tout le long du test. Si l'animal choisit le bon item alors il entend un son positif, reçoit une récompense et l'essai est comptabilisé comme un succès. Si l'animal choisit un des deux autres items alors un écran vert s'affiche avec un son désagréable associé et il doit attendre cinq secondes avant de pouvoir passer à l'essai suivant. Dans ce cas, l'essai est comptabilisé comme une erreur. Si l'animal ne choisit pas d'item dans les 60 secondes alors le même écran vert s'affiche avec le même son désagréable associé et il doit aussi attendre cinq secondes avant de pouvoir passer à l'essai suivant. Dans ce cas, le trial est comptabilisé comme un non touché. Une session de travail est composée de 20 essais. Pour l'apprentissage du test, les primates sains sont entraînés jusqu'à ce qu'ils effectuent 100% de réussite sur une session, soit 20 essais de succès à la suite. Le score global est alors calculé comme étant la moyenne des pourcentages de succès sur les quatre dernières sessions de travail, soit 80 essais. Au stade MPTP, les primates sont testés sur la rétention de ce test et donc effectuent uniquement quatre sessions de travail et le score global est calculé comme étant la moyenne des pourcentages de succès sur ces quatre sessions. Pour tous les tests cognitifs, les temps de réaction sont enregistrés et sont comparés avant et après intoxication au MPTP.

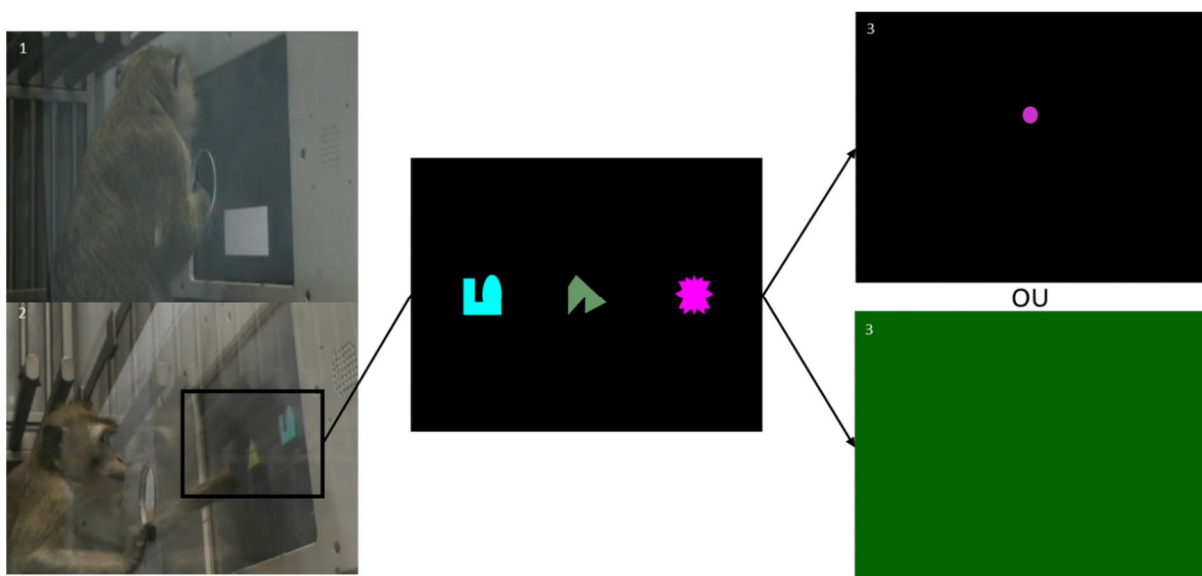


Figure 24 : Déroulement en plusieurs étapes du test de discrimination visuelle.

1. Le singe commence par lancer le test en appuyant sur un carré blanc à l'écran.
2. Il choisit un item parmi trois items de couleurs et de formes différentes.
3. S'il choisit le bon item il a une récompense, sinon un fond vert apparaît à l'écran.

4.4.2. Test de l'impulsivité

Chez l'homme l'impulsivité est essentiellement évaluée par des échelles de comportement. Cependant quelques tests cognitifs existent et peuvent évaluer deux types d'impulsivité : l'impulsivité d'action, c'est-à-dire l'inhibition d'une action pour avoir une récompense (tests de types Go-No go, stop-signal reaction time task, five-choice serial reaction time task ou encore test de Stroop), ou l'impulsivité de choix qui correspond à de la prise de décision et qui sera évoquée dans le prochain test (Esteves, Moreira, Sousa, & Leite-Almeida, 2021). Notre test évalue l'attention, l'impulsivité d'action et la tolérance aux délais. Comme déjà évoqué, un test d'impulsivité, plus ou moins similaire au notre, a déjà été utilisé par Jay Schneider et ses collaborateurs chez des singes parkinsoniens (Decamp & Schneider, 2004). Ces auteurs ont constaté que les primates après intoxication au MPTP font plus d'erreurs qu'à baseline, ce qui traduit leur impulsivité.

Dans le cas du test que nous avons mis en place, le singe doit appuyer sur un levier, qui se trouve en dessous de l'écran, pour remplir une barre de progression affichée à l'écran et obtenir une récompense (**Figure 25**). Le délai durant lequel le singe doit rester appuyé sur le levier pour remplir cette barre de progression varie entre 500 et 2500ms. Les délais sont distribués aléatoirement entre les essais. L'animal doit donc estimer le délai pendant lequel il doit rester appuyé ce qui demande beaucoup d'attention. Si l'animal réussit à rester appuyé sur le levier durant le délai nécessaire, l'essai est enregistré comme un succès et il reçoit une récompense. En revanche, si l'animal relâche le levier avant la fin du délai requis, alors l'essai est enregistré comme une erreur. Ceci est comptabilisé comme un signe d'impulsivité. Enfin, si l'animal commence un essai mais n'appuie pas sur le levier dans les 60 secondes, alors il est enregistré comme un non touché. Une session de travail est composée de 40 essais. A baseline les primates sont entraînés jusqu'à ce qu'ils effectuent 90% de réussite sur deux sessions de suite. Le score global est alors calculé comme étant la moyenne des pourcentages de succès sur les quatre dernières sessions de travail, soit 160 essais. Au stade MPTP, les primates effectuent quatre sessions de travail et le score global est calculé comme étant la moyenne des pourcentages de succès sur ces quatre sessions. Le pourcentage d'erreur par délai est ensuite analysé. Les temps de réaction sont également enregistrés et sont comparés avant et après intoxication au MPTP.

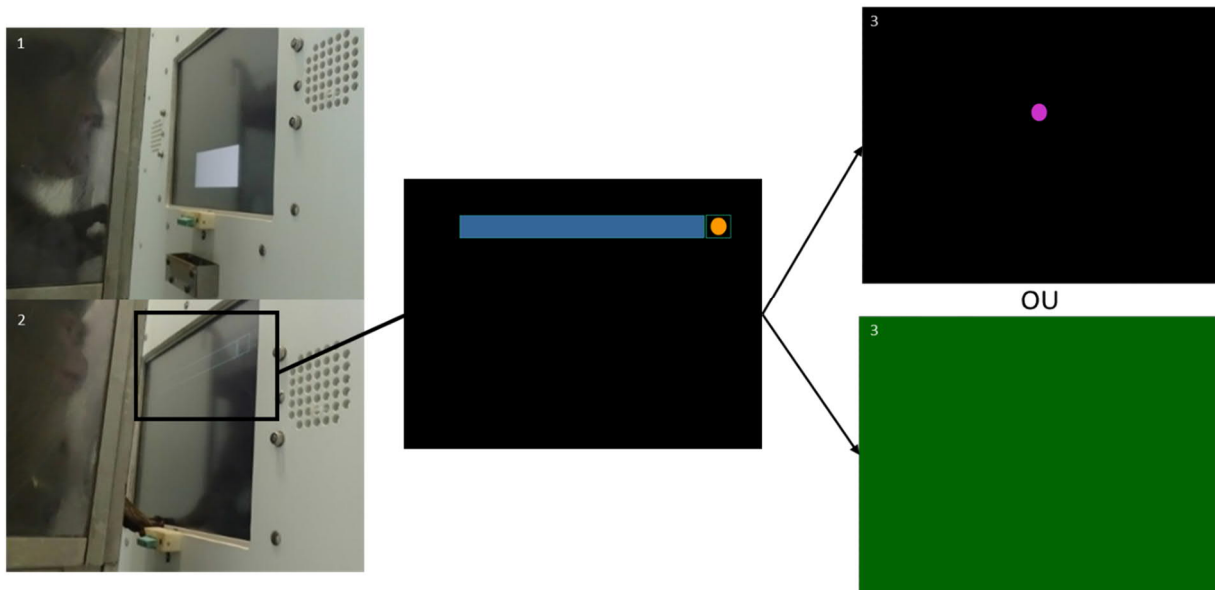


Figure 25 : Déroulement en plusieurs étapes du test de l'impulsivité.

1. Le singe commence par lancer le test en appuyant sur un carré blanc à l'écran. 2. Il appuie sur un levier pour remplir une barre de progression à l'écran. 3. S'il tient le délai imposé il a une récompense, sinon un fond vert apparaît à l'écran.

4.4.3. Test de gambling

Les troubles compulsifs et notamment le gambling sont souvent évalués en clinique par l'IGT (Iowa Gambling Task). Initialement développé pour évaluer les fonctions exécutives chez les patients lésés au niveau du cortex préfrontal ventro-médial (Bechara, Damasio, Damasio, & Anderson, 1994), ce test est plus largement utilisé pour évaluer la prise de décision et la prise de risque. Les participants doivent tirer une carte parmi quatre jeux de cartes (**Figure 26**). Chaque carte donne des récompenses et/ou des pénalités monétaires hypothétiques. Les participants ont reçu comme seul ordre de gagner autant que possible en 100 essais. Ils ne savent pas que deux jeux sont avantageux, entraînant de petits gains réguliers et de petites pertes intermittentes, produisant des gains à long terme, et deux sont désavantageux, impliquant des gains plus importants et intermittents et des pertes importantes, entraînant des pertes à long terme. La performance optimale est de sélectionner les jeux avantageux et donc de privilégier le gain à long terme par rapport aux récompenses immédiates et importantes. La version informatisée de ce test inclut des changements progressifs des contingences tout au long de la tâche. Cela implique de noter les changements dans les contingences des jeux et de modifier son comportement en conséquence (c'est-à-dire ne pas persévérer à sélectionner les mêmes jeux). Depuis, il a été démontré que le comportement des participants est le même entre ces deux versions (Bechara, Damasio, & Damasio, 2000). Les participants sains préfèrent les jeux les moins variables (Bechara et al., 2000; Bechara, Damasio, Tranel, & Damasio, 2005) alors que les patients parkinsoniens font des choix désavantageux, c'est-à-dire de grandes récompenses immédiates et des punitions différées. Les patients sont soit hypersensibles aux récompenses et/ou insensibles aux punitions. Leurs performances sont significativement altérées par rapport aux témoins sains (Evens, Hoefler, Biber, & Lueken, 2016). Dans la plupart des études, les patients parkinsoniens sont sous traitement dopaminergique et très peu de ces études ont évalué les performances de patients non traités.

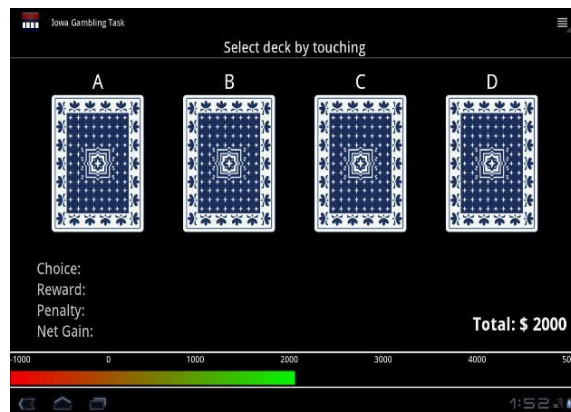


Figure 26 : Iowa Gambling Task.

Il existe aussi une version de ce test dans laquelle les participants choisissent entre deux stimuli visuels. Chaque stimulus est associé à une certaine probabilité de gain ou de perte : une paire de stimuli est associée à des gains (£1 ou rien), une deuxième paire est associée à une perte (-£1 ou rien), et une troisième paire est associée à rien. Ainsi, la première paire sert à évaluer les effets des médicaments sur la capacité d'apprendre de récompenses répétées. La deuxième paire sert à évaluer la capacité d'apprendre de punitions répétées. La troisième paire est un contrôle neutre où le sujet peut choisir indifféremment l'un des deux stimuli. Les probabilités sont réciproquement de 0,8 et 0,2 dans les trois paires de stimuli (qui sont affichées au hasard). Les participants appuient sur un bouton pour sélectionner le stimulus supérieur ou ne font rien pour sélectionner le stimulus inférieur. Ce mode de réponse est appelé Go/NoGo et permet d'identifier en imagerie les zones cérébrales activées lors de l'exécution motrice du choix (en contrastant les essais Go et NoGo). Les participants sains choisissent le gain de probabilité élevée et évitent la perte de probabilité élevée. En revanche, les patients parkinsoniens traités par L-DOPA choisissent le gain de probabilité plus élevé mais n'évite pas la perte de probabilité élevée. L'amélioration de l'activité dopaminergique centrale due à la L-DOPA a amélioré les performances de choix vers les gains mais pas l'évitement des pertes (Pessiglione, Seymour, Flandin, Dolan, & Frith, 2006).

Une adaptation de ce test fut conçue à MIRCen, en concertation avec des neurologues de l'Hôpital Henri-Mondor de Créteil. Des paires de photos sont présentées à l'écran et associées à différents niveaux de récompense (0, 1 ou 3 billes) (Figure 27). Une fois que le primate a compris le régime de récompenses, la contingence est modifiée dans 25% des essais et les photos qui étaient initialement associées à une récompense élevée (c'est-à-dire 3 billes) ou faiblement récompensée (c'est-à-dire 1 bille), ne sont désormais récompensées qu'avec une bille ou aucune bille et inversement. Le singe en choisissant une image initialement hautement récompensée prend donc un risque 25% du temps. Une session de travail est composée de 40 essais. Il existe 10 séries de paires d'images différentes. Pour ce test il n'y a ni succès ni erreur, c'est la stratégie de récompense qui est évaluée. Le score de réussite est calculé comme le nombre de billes obtenues par l'animal comparé au nombre maximal de billes qu'il aurait pu recevoir lors des quatre dernières sessions. Un non touché est enregistré lorsque l'animal ne choisit pas d'image au bout de 60 secondes.

En raison de sa complexité en termes d'administration (10 x 180 trials soit 1800 trials à chaque stade), sa faisabilité chez le singe sévèrement parkinsonien, et de la complexité de l'analyse des réponses, ce test a été remplacé par un autre.

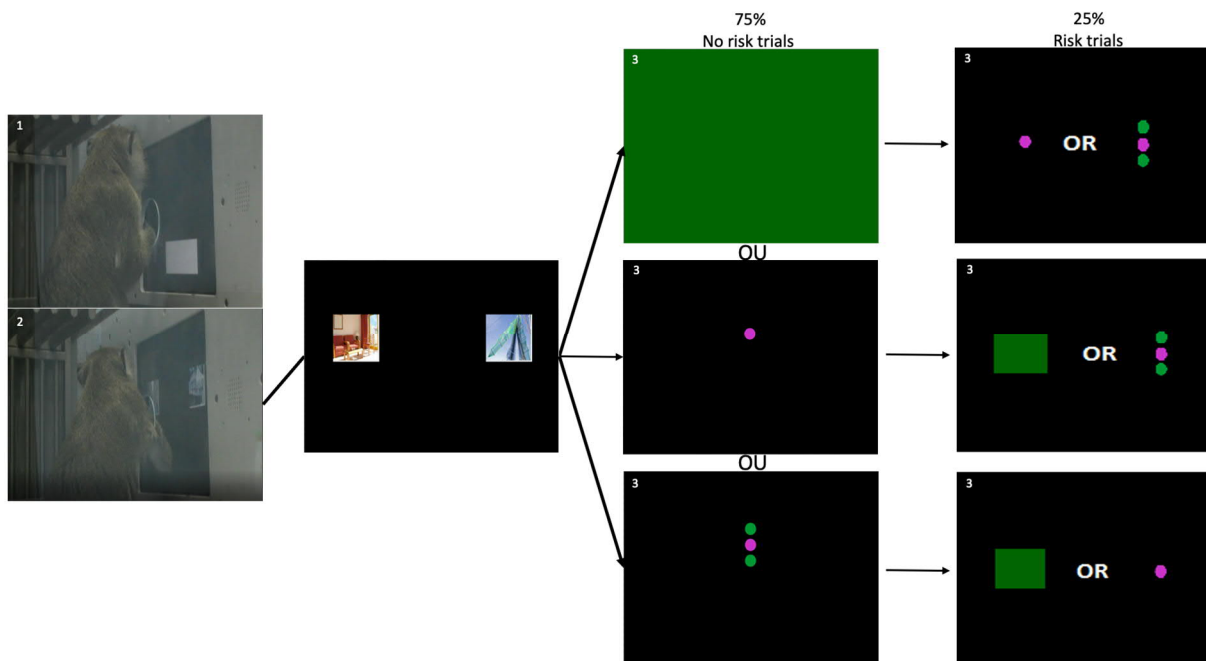


Figure 27 : Déroulement en plusieurs étapes de la 1ère version du test de gambling.

1. Le singe commence par lancer le test en appuyant sur un carré blanc à l'écran. 2. Il choisit une image parmi les deux images présentées. 3. Selon l'image qu'il choisit n'obtient pas de récompense ou une récompense ou trois récompenses et ce nombre de récompense varie dans 25% des essais.

Lors de mes recherches bibliographiques, j'ai pu observer qu'il existe un grand nombre de test de gambling chez l'homme mais très peu chez le primate et aucun chez le primate MPTP (Potenza, 2009). J'ai cependant trouvé un test de gambling, le PGT (primate gambling task), qui a été validé chez plusieurs espèces de primates dont l'homme, le chimpanzé et le capucin (Proctor, Williamson, Latzman, de Waal, & Brosnan, 2014). Il s'agit en fait d'une adaptation d'un IGT simplifié conçu pour les enfants (Mata, Sallum, Miranda, Bechara, & Malloy-Diniz, 2013). Dans ce test la première condition appelée « PGT » est identique à celle de l'IGT, c'est-à-dire un jeu à faible variabilité avec un gain moyen plus élevé et un jeu à haute variabilité avec un gain moyen moindre. En revanche, deux conditions supplémentaires ont été ajoutées :

- EPGT (équivalent PGT) où le gain moyen est le même pour les deux jeux mais avec un jeu avec une haute variabilité et l'autre à faible variabilité de récompenses

- RPGT (reverse PGT) où le jeu à haute variabilité a un gain moyen plus élevé que le jeu à faible variabilité.

Ces deux conditions permettent de dissocier une appétence pour le gain global (stratégie de maximisation des gains) d'une aversion à la variabilité (stratégie d'évitement de la variabilité). L'ordre des conditions est contrebalancé pour éliminer les effets d'ordre. Les primates sains réagissent comme le font les hommes dans la structure du PGT (IGT chez l'homme). Pour les primates le choix se faisait

entre deux tas de petites boîtes opaques contenant des récompenses (Figure 28). Les tas différaient dans leur structure de gain en fonction de la condition.



Figure 28 : Exemple d'un singe capucin sain effectuant le PGT. D'après (Proctor et al., 2014).

Nous avons adapté ce test en remplaçant les tas de contenants par des images sur écran tactile et des billes au gout sucré en récompense (**Figure 29**). Une session de travail est composée de 40 essais et quatre sessions de travail ont été réalisées par condition. Ce test ayant été conçu plus tardivement, aucun primate de cette étude ne l'a performé à baseline et seul deux d'entre eux l'ont performé au stade MPTP. Chez les patients parkinsoniens les altérations de la prise de décision et de la prise de risque se développent à la suite de la prise de traitement dopaminergique. Nous avons donc également testé si la performance des primates MPTP était altérée par l'administration de L-DOPA (administration orale de 20mg/kg de L-DOPA 1h30 avant le début du test). Pour ce test il n'y a ni succès ni erreur, c'est la stratégie de récompense qui est évaluée. Un non touché est enregistré lorsque l'animal ne choisit pas d'image au bout de 60 secondes. Les temps de réaction sont enregistrés et sont comparés avant et après intoxication au MPTP.

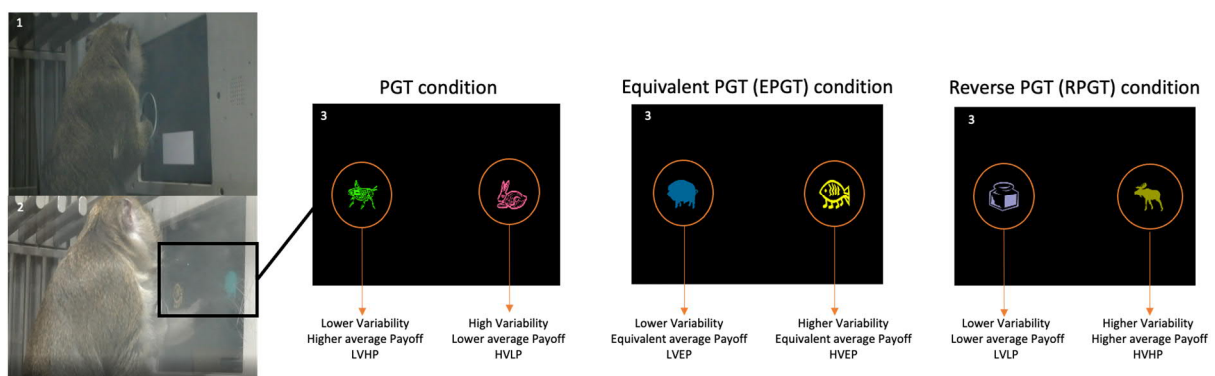


Figure 29 : Déroulement en plusieurs étapes de la 2^{ème} version du test de gambling.

1. Le singe commence par lancer le test en appuyant sur un carré blanc à l'écran. 2. Il choisit un item parmi les deux items présentés. 3. Selon l'item qu'il choisit il obtient plus ou moins de récompense (entre 0 et 6).

1.1.1 Test de motivation

Ce test a émergé de l'observation non publiée que les singes parkinsoniens traités par thérapie génique, dans le putamen sensori-moteur à MIRCen semblaient bouger plus dans leur cage d'hébergement que lors des évaluations motrices. Cela pourrait être due au fait que dans leur cage les animaux ont pour motivation de chercher de la nourriture ou avoir des interactions sociales avec les autres animaux autour d'eux. Ce test a donc été conçu, à MIRCen, pour évaluer l'activité dirigée vers un but, et son absence en cas d'apathie.

La cage est identique à celle utilisée pour les tests moteurs mais les portes latérales ont été modifiées pour pouvoir y accommoder un écran tactile d'un côté et un réceptacle pour les récompenses de l'autre côté (**Figure 30**). Dans ce test le singe doit simplement appuyer sur un carré blanc pour avoir une récompense. Il doit alors aller chercher la récompense de l'autre côté de la cage pour pouvoir lancer un autre essai. Des rayons infrarouges placés au niveau du réceptacle détectent si l'animal est venu prendre sa récompense et communiquent ensuite avec l'écran tactile pour lancer un nouvel essai. Une session de travail dure 40 minutes. Le nombre d'essais lancés durant ces 40 minutes est enregistré. A baseline, les singes sont entraînés jusqu'à ce qu'ils fassent plus de 40 essais en une session, soit un essai par minute, et ce quatre jours de suite. Le score est calculé comme étant la moyenne du nombre d'essais effectués sur ces quatre sessions. Au stade MPTP, le singe effectue quatre sessions de travail et le nombre d'essais est moyenné. Comme pour tous les tests cognitifs, les temps de réaction sont enregistrés et sont comparés avant et après intoxication au MPTP.

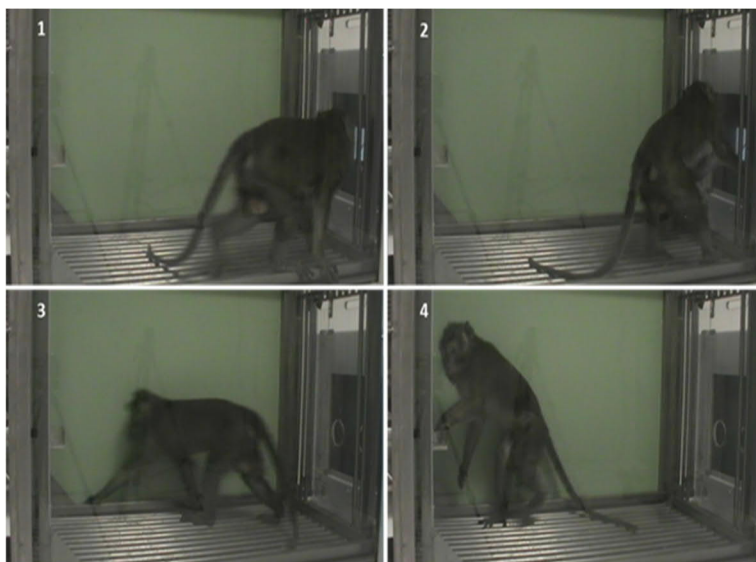


Figure 30 : Déroulement en plusieurs étapes du test de motivation.

- 1-2. Le singe commence par lancer le test en appuyant sur un carré blanc à l'écran et il obtient une récompense.
- 3-4. Il doit aller chercher cette récompense à l'autre bout de la cage afin de pouvoir déclencher un nouvel essai.

1.2 Évaluation du cycle activité/repos

Au vu des contraintes techniques de la mise en place de vidéos infra-rouges dans les cages d'hébergement et de la mise en place d'enregistrements électrophysiologiques la nuit, nous avons décidé d'utiliser la température corporelle comme indicateur indirect de l'activité des animaux. Cette méthode avait par ailleurs déjà été utilisée chez le primate parkinsonien (Almirall et al., 2001) en combinaison avec l'analyse de l'activité motrice pour étudier les troubles du cycle activité/repos. Cette étude avait ainsi démontré qu'il n'y avait pas de différence entre les résultats issus du suivi de température et ceux issus de l'activité locomotrice.

Des puces télémétriques sous-cutanées ont donc été implantées chez les primates. L'utilisation de ces puces à l'avantage d'être peu invasif et de limiter la manipulation des animaux. Dans un premier temps, nous avons utilisé les puces télémétriques Anipill® (**Figure 31**). L'avantage de ce système est que les données peuvent être récupérées régulièrement via une connexion sans fil avec un moniteur placé près de la cage d'hébergement de l'animal. Le système Anipill® a une précision de 0,1°C à 0,2°C. Ces puces ont été implantées par voie intrapéritonéale (i.p.) chez quatre animaux sains (5 mois d'enregistrement) et chez nos 8 animaux au stade MPTP (17 mois d'enregistrement). La température était prélevée en continu toutes les 15 minutes.



Figure 31 : Dispositif de télémétrie pour suivi de la température corporelle de chez Anipill®.

Suite à des problèmes techniques de synchronisation des données via le système sans fil et de durée de vie de la batterie, nous avons décidé de changer de dispositif. Nous utilisons actuellement les puces télémétriques STAR:ODDI® (**Figure 32**). Contrairement au système Anipill®, ce système ne permet pas de récupérer les données en continu et nécessite l'explantation de la puce pour ce faire. En revanche, ce dispositif a un système de batterie beaucoup plus fiable. Ces puces ont été implantées au niveau intra scapulaire (i.s.) chez trois de nos animaux au stade MPTP (5 mois d'enregistrement). La température était prélevée en continu toutes les 30 minutes.



Figure 32 : Dispositif de télémétrie pour suivi de la température corporelle de chez STAR:ODDI®.

Il avait été montré précédemment (Fifel et al., 2014) que la perturbation du cycle activité/repos chez le primate MPTP se caractérisait par une réduction de sa stabilité et de son amplitude. Nous avons donc décidé d'évaluer sa stabilité en moyennant toutes les données des primates sains et des primates MPTP acquises sur 24h afin d'avoir un profil d'évolution de la température, et donc du cycle activité/repos journalier. Afin d'évaluer son amplitude, une analyse de fréquences par transformation de fourier a été réalisée.

1.3 Statistiques

Toutes les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm SEM. Les différences de performances cognitives avant et après intoxication au MPTP ont été évaluées par des tests de Wilcoxon pour les tests de discrimination visuelle et de motivation et par une analyse de variance bidirectionnelle (2 way ANOVA) pour le test d'impulsivité. Les différences de températures moyennes et d'amplitudes de variation de température moyennes ont été évaluées par des tests de Student. Les performances au test de gambling n'ont pas fait l'objet d'analyses statistiques car seul deux primates l'ont réalisé après intoxication au MPTP. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative dans toutes les analyses. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism GraphPad (San Diego, CA).

2 Résultats

2.1 Intoxication au MPTP

Suite à l'intoxication au MPTP, tous les animaux ont développé des symptômes parkinsoniens sévères. L'apparition et la sévérité de ces symptômes varient entre les deux groupes d'intoxication selon les régimes utilisés. Le premier groupe a été intoxiqué avec des doses fortes et a développé des symptômes parkinsoniens très sévères très rapidement alors que cela a été plus progressif pour le deuxième groupe

d'intoxication en accord avec une intoxication plus graduelle et chronique (**Figure 33**). Ce changement de régime a été introduit pour respecter les point limites établies dans le permis éthique et assurer le bien-être animal. Malgré certaines variations individuelles, tous les primates atteignent un score clinique supérieur à 8, qui correspond à des symptômes robustes, et qui reste stables pendant plusieurs mois. Le score clinique est en moyenne de $10,88 \pm 0,35$ points une fois stablement parkinsonien. Ceci est confirmé par l'analyse de l'activité locomotrice spontanée qui montre que très rapidement après le début de l'intoxication au MPTP, les distances totales parcourues lors des évaluations motrices chutent, ces diminutions demeurant assez stables dans le temps. On observe une grande variabilité entre l'activité motrice basale des différents individus mais en moyenne les TDM sont diminuées de $94,36 \pm 0,6\%$ par le traitement MPTP.

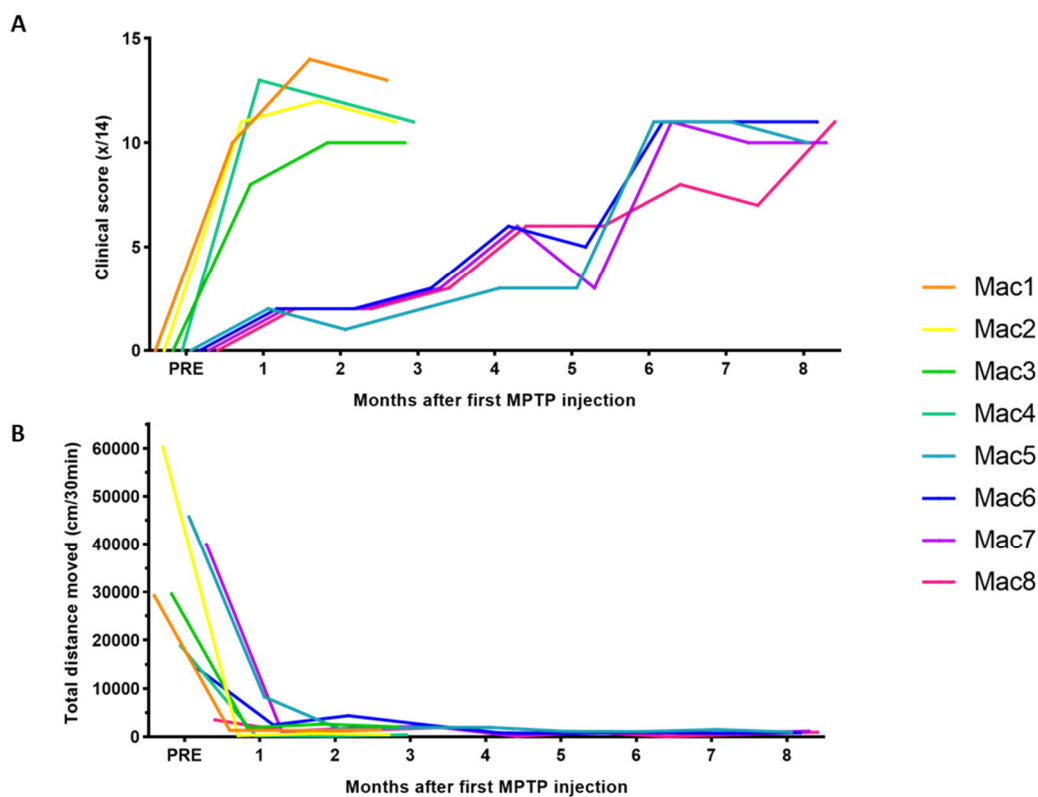


Figure 33 : Analyse du comportement moteur des animaux suite à l'intoxication au MPTP. **A)** Analyse des scores cliniques. PRE = score clinique à baseline avant l'intoxication au MPTP. **B)** Quantification de l'activité motrice spontanée (TDM – Total distance moved) via Ethovision®. PRE = moyenne des trois dernières TDM à baseline.

2.2 Évaluation des déficits cognitifs

Le test de discrimination visuelle est le premier test effectué par les primates que ce soit avant ou après intoxication au MPTP. On peut observer qu'après intoxication au MPTP, les 8 primates font moins de

réponses « succès » ($77,5 \pm 4,39\%$ vs $96,72 \pm 0,97\%$, $p=0,0078$), plus d'erreurs ($17,34 \pm 4,5\%$ vs $2,97 \pm 0,91\%$, $p=0,0078$) et plus de réponses « non touché » ($5,16 \pm 1,92$ vs $0,31 \pm 0,2\%$, $p=0,0469$) qu'avant intoxication (**Figure 34 A**). Cette différence pourrait être due à un léger déficit d'attention, de mémoire de travail ou à des atteintes visuelles. Cependant, les primates sévèrement MPTP réussissent quand même à effectuer cette tâche avec un bon score de réussite, ce qui signifie qu'ils sont capables de réaliser des tests cognitifs sur écran tactile. Le temps de réaction moyen est quant à lui significativement augmenté ($3,28 \pm 0,37s$ vs $1,71 \pm 0,22s$, $p=0,0078$) après intoxication au MPTP (**Figure 34 B**).

Lors du test d'impulsivité on a pu observer que les 8 primates ont tendance à globalement faire moins de succès ($67,34 \pm 10,36\%$ vs $88,44 \pm 2,37\%$, n.s.), plus d'erreurs ($15,76 \pm 4,78\%$ vs $8,05 \pm 1,67\%$, n.s.) et plus de non touché ($16,83 \pm 10,6\%$ vs $3,44 \pm 1,75$, n.s.) une fois intoxiqués au MPTP. On a par la suite analysé les résultats par délais afin de voir si les primates MPTP ont plus de difficultés pour les délais les plus longs. On s'est aperçu que ce n'est pas le cas et que les primates une fois MPTP performant moins bien à cette tâche indépendamment des délais imposés, même si on observe une tendance à relâcher le levier plus souvent pour les délais les plus longs que ce soit au stade baseline ou MPTP (**Figure 34 C**). Les primates une fois MPTP arrivent moins bien à respecter les délais et lâchent plus souvent le levier qu'à baseline ($p=0,0017$). Le temps de réaction moyen n'est quant à lui pas augmenté de manière significative ($2,53 \pm 1,07s$ vs $1,45 \pm 0,08s$, n.s.) après intoxication au MPTP (**Figure 34 D**).

Lors du test de motivation on a pu observer qu'après intoxication au MPTP les primates effectuent beaucoup moins d'essais qu'à baseline ($14,56 \pm 4,22$ vs $139,25 \pm 30,45$, $p=0,0078$) (**Figure 34 E**). L'impact de l'intoxication au MPTP sur le comportement locomoteur et donc la capacité des primates à se déplacer et faire des allers-retours pour aller chercher la récompense ne peut pas être exclu. La part exacte de motivation/apathie reste à définir après l'administration d'un traitement. Le temps de réaction moyen est très fortement augmenté après intoxication au MPTP ($100,14 \pm 22,15s$ vs $10,04 \pm 2,77s$, $p=0,0078$) (**Figure 34 F**).

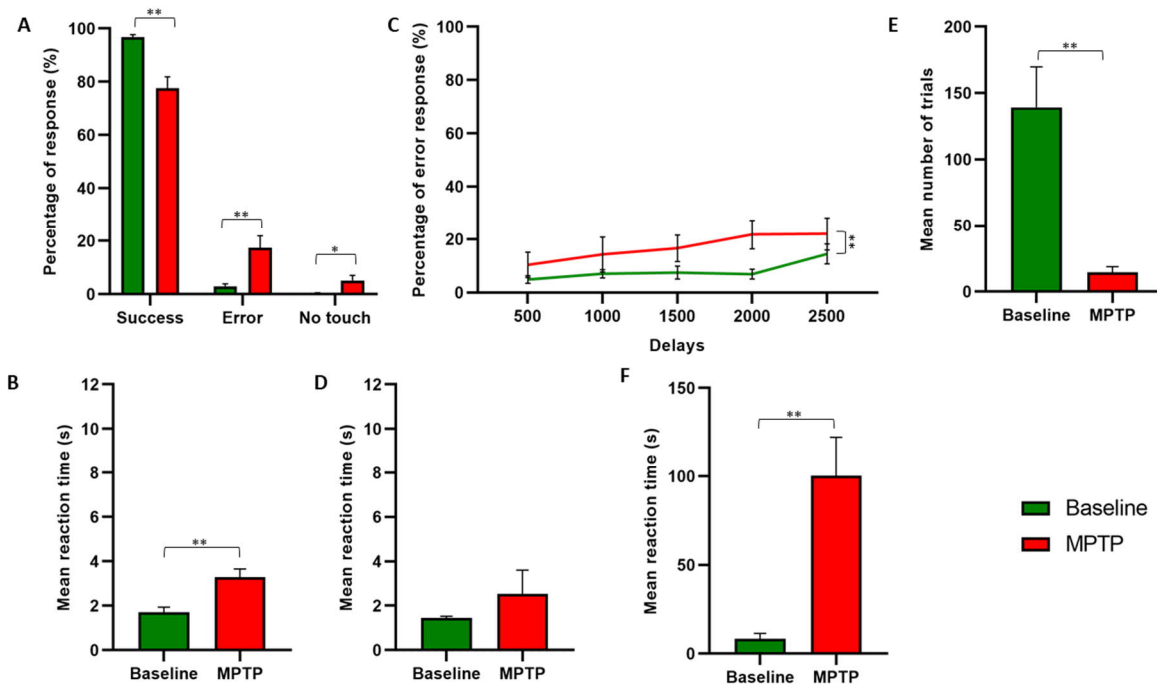


Figure 34 : Analyse des performances aux tests cognitifs sur les quatre dernières sessions de travail des animaux suite à l'intoxication au MPTP.

A) Moyenne des pourcentages de réussite, erreur et non touché du test de discrimination visuelle. **B)** Moyenne des temps de réaction du test de discrimination visuelle. **C)** Moyenne des pourcentages d'erreur selon les délais du test d'impulsivité. **D)** Moyenne des temps de réaction du test d'impulsivité. **E)** Moyenne du nombre d'essais effectués lors du test de motivation. **F)** Moyenne des temps de réaction du test de motivation. Les valeurs sont représentées comme moyenne \pm SEM.

Lors du test de gambling, les performances de 15 primates sains ont été comparées à celles de deux de nos primates au stade MPTP, après administration de L-DOPA ou non. Lors de la condition classique PGT (une image à faible variabilité mais dont le gain moyen est supérieur - LVHP vs une image à forte variabilité mais dont le gain moyen est inférieur - HVLP) les performances des primates sains et MPTP sont quasiment identiques ($66,25 \pm 3,13\%$ vs $66,54 \pm 5,65\%$ pour l'image LVHP et $32,81 \pm 4,06\%$ vs $32,75 \pm 5,67\%$ pour l'image HVLP) (**Figure 35 A**). La performance des primates MPTP n'est pas altérée par l'administration aiguë de L-DOPA (une seule administration orale de 20mg/kg de L-DOPA 1h30 avant le test). Au contraire les primates MPTP sous L-DOPA ont une légère tendance à choisir encore plus l'image LVHP ($71,56 \pm 23,44\%$ vs $66,25 \pm 3,13\%$). Ceci est peut-être dû au fait qu'ici le traitement L-DOPA est administré en une seule dose et non pas chroniquement sur plusieurs années comme chez les patients parkinsoniens. Le temps de réaction moyen est fortement augmenté ($5,33 \pm 4,25s$ vs $2,43 \pm 0,28s$) après intoxication au MPTP et est amélioré ($4,66 \pm 0,15$ vs $5,33 \pm 4,25s$) par le traitement L-DOPA (**Figure 35 D**).

Pour la condition EPGT (une image à faible variabilité et dont le gain moyen est équivalent - LVEP vs une image à forte variabilité et dont le gain moyen est équivalent - HVEP) on observe que les primates MPTP ont tendance à un peu plus choisir l'image HVEP comparé aux singes sains ($57,81 \pm 6,56\%$ vs $47,17 \pm 6,38\%$). Les performances des singes MPTP ne sont pas altérées par le traitement aigu à la L-DOPA ($53,13 \pm 5\%$ vs $57,81 \pm 6,56\%$) (**Figure 35 B**). Au contraire les primates MPTP sous L-DOPA ont une légère tendance à choisir l'image la moins variable. Le temps de réaction moyen est fortement augmenté ($5,54$

$\pm 4,48s$ vs $2,24 \pm 0,27s$) après intoxication au MPTP et est amélioré ($3,86 \pm 2,13s$ vs $5,54 \pm 4,48s$) par le traitement L-DOPA (**Figure 35 D**).

Pour la condition RPGT (une image à faible variabilité et dont le gain moyen est inférieur – LVLP vs une image à forte variabilité dont le gain moyen est supérieur – HVHP) on observe que les primates MPTP ont une légère tendance à plus choisir l'image LVLP comparé aux singes sains ($21,56 \pm 5,93\%$ vs $13,04 \pm 3,5\%$). Les performances des singes MPTP sont légèrement modifiées par le traitement aigu à la L-DOPA et les primates choisissent un peu plus l'image à haute variabilité HVHP ($86,88 \pm 11,88\%$ vs $77,5 \pm 6,88\%$) (**Figure 35 C**). Le temps de réaction moyen est fortement augmenté ($5,11 \pm 3,81s$ vs $2,68 \pm 0,27s$) après intoxication au MPTP et est amélioré ($4,44 \pm 0,31s$ vs $5,11 \pm 3,81s$) par le traitement L-DOPA (**Figure 35 D**).

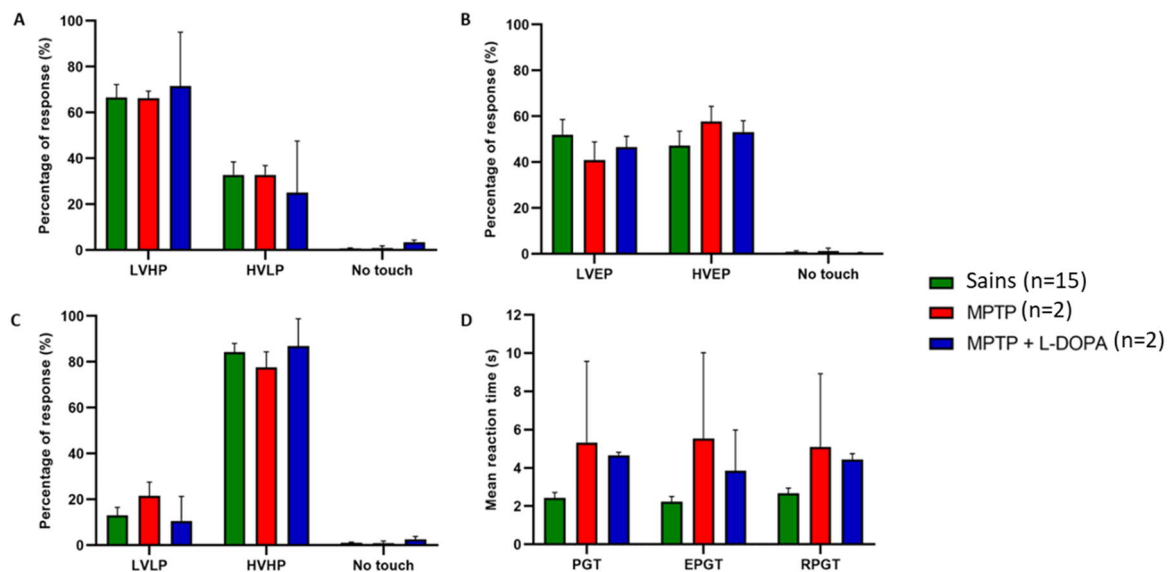


Figure 35 : Analyse des performances au test de gambling de quinze singes sains et de deux singes MPTP sous traitement L-DOPA ou non sur les quatre dernières sessions de travail.

A) Moyenne des pourcentages de choix de la condition PGT. LVHP = Low Variability High Payoff et HVLP = High variability Low Payoff **B)** Moyenne des pourcentages de choix de la condition EP GT. LVEP = Low variability Equivalent Payoff et HVEP = High variability Equivalent Payoff **C)** Moyenne des pourcentages de choix de la condition RP GT. LVLP = Low Variability Low Payoff et HVHP = High Variability High Payoff. **D)** Moyenne des temps de réaction pour les trois conditions. Les valeurs sont représentées comme moyenne \pm SEM.

2.3 Évaluation des altérations du cycle activité/repos

Nous avons utilisé la température corporelle comme indice indirect de l'activité des animaux dans le but d'étudier les effets de l'intoxication au MPTP sur le cycle circadien. Nous avons compilé toutes les données de température enregistrées pendant 24h de quatre singes sains et de 8 singes parkinsoniens pour comparer leurs profils de température durant la journée. On peut ainsi noter que les profils de température des singes sains et des singes MPTP durant la journée sont très différents (**Figure 36 A**). Pour les singes sains, la température augmente progressivement avant que la lumière de l'animalerie ne s'allume et diminue progressivement après leur nourrissage (vers 16h) jusqu'à l'extinction des lumières. En revanche, les primates MPTP montrent une température plus stable avec moins de variations au cours

des 24h. En effet, le cycle journalier activité/repos est moins marqué pour les animaux MPTP. Cela a été confirmé par l'analyse de l'amplitude de variation de la température dans la journée (**Figure 36 B**). Les singes MPTP présentent une amplitude de variation largement inférieure aux singes sains ($0,49 \pm 0,14^\circ\text{C}$ vs $0,89 \pm 0,10^\circ\text{C}$, $p=0,0007$). Cette baisse d'amplitude est liée au fait que les animaux MPTP montrent des périodes de sommeil diurnes et de périodes de réveil nocturnes. La température moyenne des primates MPTP est significativement supérieure à celle des singes sains ($37,84 \pm 0,21^\circ\text{C}$ vs $37,47 \pm 0,14^\circ\text{C}$, $p=0,001$).

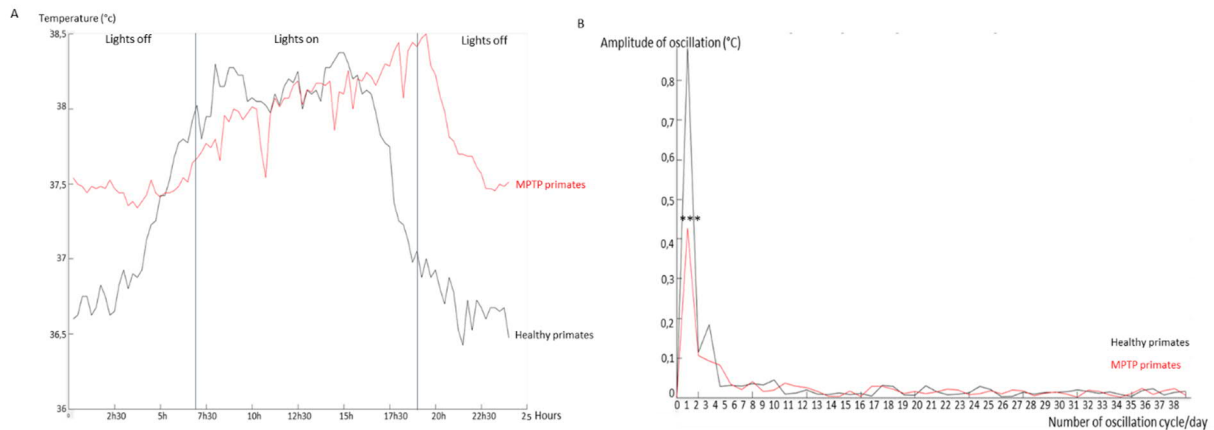


Figure 36 : Analyse du cycle activité/repos via la température corporelle de primates sains (n=4) et de primates MPTP (n=8).

A) Moyenne des profils de température sur 24h **B)** Moyenne des fréquences des amplitudes de variation de la température.

Comme déjà évoqué, nous avons changé de dispositif pour trois de nos singes parkinsoniens. Nous avons ainsi pu observer que pour mac6 et mac 8, les profils de température sont très similaires au profil des singes MPTP observés avec l'ancien dispositif (**Figure 37 A**). En revanche, mac7 semble avoir un profil de température un peu différent avec une amplitude de variation plus élevée qui ressemble plus à un profil de singe sain. La température moyenne pour ces trois primates MPTP est de $36,26 \pm 0,49^\circ\text{C}$ (soit $1,58^\circ\text{C}$ de différence avec l'autre dispositif). Les amplitudes de variation de température sont plus fortes qu'avec le dispositif précédent mais cela est notamment dû au positionnement des puces au niveau intra scapulaire (vs i.p.) (**Figure 37 B**). Ces singes MPTP ont une amplitude de variation de $0,97 \pm 0,29^\circ\text{C}$ dans un cycle de 24h.

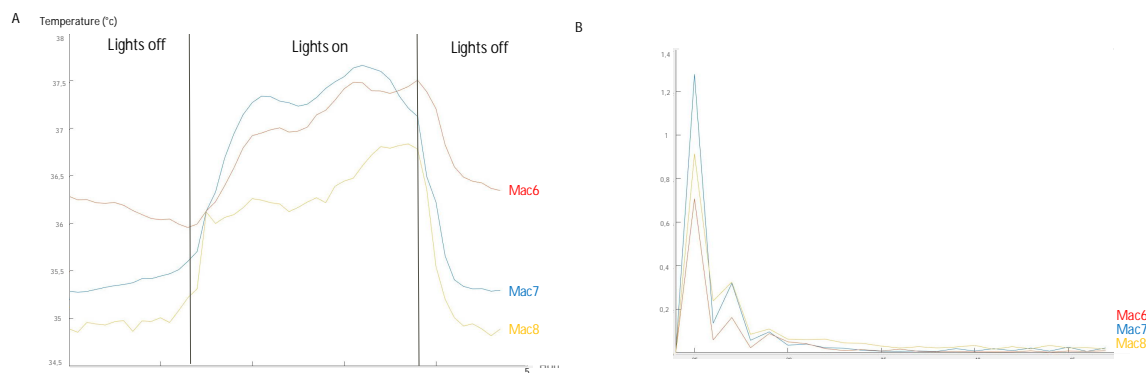


Figure 37 : Analyse du cycle activité/repos via la température corporelle de primates MPTP (n=3).
A) Profils de température sur 24h **B)** Fréquences des amplitudes de variation de la température.

3 Discussion

Jusqu'à présent, l'évaluation des déficits non-moteurs chez le primate MPTP n'a été réalisée, quasiment exclusivement, que chez des singes intoxiqués chroniquement par de faibles doses et donc asymptomatiques ou peu symptomatiques d'un point de vue moteur. Or ces modèles ne sont pas adaptés à l'évaluation de thérapies à visée symptomatique, telles que celles que nous évaluons au laboratoire. Afin d'être le plus translationnel et prédictif possible, il faut que les animaux soient sévèrement atteints pour pouvoir mettre en évidence de possibles effets thérapeutiques à la fois sur les symptômes moteurs et les symptômes non moteurs. Dans cette étude nous avons donc développé de nouveaux outils pour explorer les NMS chez un modèle primate sévère de la MP par intoxication au MPTP à forte dose. Afin d'explorer un large spectre de déficits cognitifs et limbiques chez ce modèle, nous avons conçu une batterie de tests cognitifs sur écran tactile. Nous avons également étudié l'altération du cycle activité/repos chez ce modèle via le suivi la température corporelle. L'ensemble des résultats indiquent que : 1) des primates intoxiqués au MPTP sévèrement symptomatiques sont capables de réaliser des tests cognitifs sur écran tactile, 2) ces tests sont capables de mettre en évidence des déficits cognitifs et limbiques chez ces singes sévèrement atteints et 3) la température corporelle peut être utilisée comme biomarqueur de l'altération activité/repos chez ces primates sévèrement symptomatiques.

Le test de discrimination visuelle est un test contrôle puisqu'il ne dépend pas de l'intégrité de l'axe-fronto-striatal. Le but de ce test était de vérifier les performances des singes MPTP sur une tâche simple. Cependant, nous avons observé dans notre étude que les performances des primates avant et après intoxication au MPTP sont significativement différentes. Ceci peut s'expliquer par plusieurs raisons. Tout d'abord, et comme pour tous les tests cognitifs de la batterie, la baisse des performances des primates au stade MPTP peut être liée à des déficits qui ne sont pas associés à la tâche en elle-même tels que des difficultés motrices (difficultés et lenteur à réaliser des mouvements et donc à toucher l'écran tactile), des déficits attentionnels, de mémoire de travail ou bien encore de motivation. En effet, la perte dopaminergique aboutit à des changements dans le renforcement de la récompense, le lien entre la récompense et l'action diminuant (Hämmerer & Eppinger, 2012). Il faut cependant garder en tête que c'est aussi le cas lorsque que des patients parkinsoniens effectuent des tests cognitifs en clinique. Une

autre explication à cette baisse des performances au stade parkinsonien est que le test de discrimination visuelle est le premier test cognitif effectué après plusieurs mois de pause. Il a été observé (observations du laboratoire) que les performances au premier test effectué après une période d'arrêt sont toujours réduites car il faut un temps d'adaptation pour que le primate se souvienne du test, de la règle et de la dynamique du test. D'ailleurs, il est intéressant de noter que l'on observe pour le test de discrimination visuelle, au stade MPTP, une progression/normalisation des scores au fur et à mesure des sessions ($70 \pm 9,35\%$ de réussite à la première session vs $83,75 \pm 3,75\%$ à la quatrième et dernière session). Une autre explication pourrait être que les primates au stade MPTP performant moins bien à cause de déficits visuels. En effet il a été observé chez le singe MPTP des déficits visuels similaires à ceux des patients : anomalies dépendantes de la fréquence spatiale (Ghilardi et al., 1988), déficits des mouvements oculaires et des saccades (Schultz et al., 1989), atteintes rétinienne liées à la dégénérescence des neurones dopaminergiques rétinien et de leurs cellules amacrines postsynaptiques engendrant une baisse du taux de dopamine dans la rétine (Cuenca et al., 2005). Quant à la perception des couleurs, les études chez l'homme ne vont pas toutes dans le même sens. Certaines montrant qu'il existe des déficits de discrimination des couleurs (Price et al., 1992; Regan et al., 1998) et d'autres non (Bertrand et al., 2012; Pieri et al., 2000). Cela n'a pour le moment jamais été étudié chez le primate MPTP. La seule autre équipe ayant réalisé un test de discrimination visuelle simple chez le primate MPTP est celle de Schneider qui n'avait pas observé de différence significative entre les performances des primates avant et après intoxication au MPTP dans un modèle asymptomatique (Schneider & Kovelowski, 1990; Schneider & Pope-Coleman, 1995; Schneider & Roeltgen, 1993). Notre modèle étant plus sévèrement atteint, les déficits moteurs, d'attention, de mémoire de travail et de motivation sont certainement plus marqués. De plus, Schneider et ses collaborateurs avaient placé le critère de réussite à 90% à baseline alors que nous avons fixé un critère plus stringant de 100%. La différence entre avant et après intoxication au MPTP est dans ce cas moins marquée. Malgré tout, nos singes parkinsoniens performant cette tâche avec un score de réussite de 70%, ce qui prouve qu'ils sont capables d'effectuer des tests cognitifs à un stade MPTP sévère.

Le test d'impulsivité permet d'évaluer l'impulsivité d'action et la tolérance aux délais. Dans notre étude, nous avons observé que les singes avant intoxication au MPTP ont une légère tendance (non significative) à plus souvent relâcher prématurément le levier pour les délais les plus longs. C'est également ce qui a été observé dans d'autres études utilisant le même type de test chez le rat (Baunez, Nieoullon, & Amalric, 1995) et chez le macaque (Decamp & Schneider, 2004) parkinsonien. Dans ces deux études, l'intoxication au 6-OHDA pour les rats ou au MPTP par faible dose chronique pour les macaques, a accentué ce phénomène et les animaux parkinsoniens tiennent moins bien les plus longs délais. Nous nous attendions à observer le même phénomène chez nos singes après intoxication au MPTP mais cela n'a pas été le cas. La tendance à plus souvent relâcher prématurément le levier pour les délais les plus longs n'a pas été accentuée par l'intoxication au MPTP. En revanche les primates performant significativement moins bien qu'à baseline, quel que soit le délai considéré. Comme pour le test de discrimination visuelle, cela peut être attribué en partie aux déficits moteurs et attentionnels présents chez ces animaux. Ces erreurs pourraient également être dues à des déficits dans l'évaluation du délai nécessaire pour remplir la barre de progression à l'écran. Des déficits dans l'estimation de la durée ont été observés chez le patient parkinsonien qui globalement sous-estime les durées (Pastor, Jahanshahi, Artieda, & Obeso, 1992).

Dans de précédentes études, l'évaluation de la motivation chez le primate MPTP avait été faite par l'utilisation d'échelles de comportement subjectives ou de tests non-spécifiques (Brown et al., 2012; Schneider et al., 1988). Au contraire, notre tâche est basée sur le même principe que celles réalisées en clinique, c'est-à-dire l'évaluation de l'activité dirigée vers un but, et son absence en cas d'apathie. Les patients parkinsoniens font ainsi moins d'efforts pour une récompense donnée que les sujets sains. C'est également ce que nous observons dans notre étude puisque les primates sévèrement symptomatiques réalisent beaucoup moins d'allers-retours pour aller chercher leurs récompenses. La part exacte de motivation/apathie reste à définir après l'administration d'un traitement.

Pour le test de gambling, il est difficile d'interpréter les résultats obtenus car seuls deux primates l'ont réalisé au stade MPTP. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les performances des deux primates sont assez différentes, et ce d'autant plus sous traitement L-DOPA aigu. Cependant, nous avons observé que les performances des deux singes MPTP sont assez semblables à celles des singes sains et cela dans toutes les conditions du test. Nous nous attendions à ces résultats puisqu'il a été montré que ce sont les traitements dopaminergiques (notamment par les agonistes) qui sont responsables des altérations de la prise de décision chez les patients parkinsoniens (Evens et al., 2016). Afin de voir si cela était également le cas dans notre modèle MPTP, nous avons évalué les performances sous traitement aigu oral L-DOPA et en l'absence de tout traitement dopaminergique. Dans les deux conditions, les performances des primates sont assez similaires. Il reste difficile de comparer les effets d'un traitement aigu chez le singe à des années de traitement chez le patient. Il serait donc intéressant dans une étude ultérieure que les singes MPTP performant ce test sous traitement chronique L-DOPA. En revanche, le traitement chronique à la L-DOPA déclenche rapidement des LIDs notre modèle (Aron Badin et al., 2013) et il faudrait donc plutôt mettre en place un traitement semi-chronique. Cependant, ce test nous permettra ensuite de comparer les performances avec celles d'animaux traités avec d'autres types de thérapies.

Dans cette étude nous avons suivi la température corporelle des animaux afin de visualiser indirectement l'impact de l'intoxication au MPTP sur le cycle activité/repos. Le premier système de suivi de température que nous avons utilisé nécessitait une proximité entre la puce implantée et le moniteur qui stockait les données (présent dans la pièce d'hébergement) afin qu'ils puissent se synchroniser par wifi. Les puces ont été donc placées dans un premier temps en i.p. pour maximiser la synchronisation et limiter les interférences avec l'acier des cages. Le nouveau système de suivi que nous utilisons actuellement permet de sauvegarder les données de température sur la puce directement et donc de l'implanter dans une région du corps peu accessible et peu gênante pour les primates (intra-scapulaire). La différence entre le site d'implantation i.p. ou s.c. a déjà été examinée dans une autre étude (Taffe, 2011) et les données dérivées de ces deux principaux sites d'implantation sont comparables. Les températures diffèrent d'environ 0,5 à 0,8 °C selon les emplacements des implants, la température i.p. étant systématiquement plus élevée. Ces données nous permettent donc de comparer les résultats obtenus chez nos primates en utilisant deux sites d'implantation différents. En termes d'altération du cycle activité/repos, notre étude confirme ce qui a déjà été observé dans d'autres études (Almirall et al., 2001; Almirall et al., 1999; Barraud et al., 2009; Fifel et al., 2014; Vezoli et al., 2011), c'est-à-dire un cycle fragmenté et une amplitude de variation diminuée chez les singes parkinsoniens, notamment liée à une diminution globale de l'activité mais aussi à des périodes d'activité durant la nuit et des périodes de somnolence durant la journée.

Notre étude est donc la première à avoir évalué un large spectre de déficits non-moteurs chez le primate MPTP sévèrement parkinsonien. On a ainsi pu valider différents biomarqueurs qui ont pu être utilisés

dans la deuxième partie de ma thèse lors de l'évaluation de thérapies géniques chez le primate MPTP. Dans le futur, il sera intéressant d'explorer les NMS via ces tests cognitifs (plus particulièrement le test de gambling) et ce suivi de la température corporelle chez plus d'animaux, afin d'étoffer nos résultats. Il serait également possible de mettre en place d'autres outils permettant d'explorer d'autres symptômes non-moteurs chez le primate MPTP tels que la constipation, les altérations des relations sociales, l'anosmie ou encore le suivi de la pression artérielle (hypotension orthostatique).

**PARTIE II : EVALUATION D'UNE STRATEGIE
DE THERAPIE GENIQUE REGULABLE CHEZ
LE MODELE MPTP PRIMATE NON-
HUMAIN**

5. Contexte

5.1. Généralités sur les thérapies géniques

La thérapie génique est déjà très largement utilisée comme traitement en cancérologie, en infectiologie ou encore en cardiologie. Plusieurs stratégies sont possibles :

- Introduire des gènes à visée thérapeutique.
- Éliminer, corriger ou remplacer des gènes défectueux.

Les gènes peuvent être transférés par électroporation (électrotransfert), par micro-injection, ou par sonoporation. Cependant, dans la très grande majorité des cas, ils le sont par l'intermédiaire d'un vecteur viral. Un vecteur viral est un virus dont les séquences codant pour la réplication ont été éliminées et remplacées par des séquences codant pour le/les gènes d'intérêts.

Il existe trois grands types de vecteurs viraux utilisés en neurosciences et dont les principales caractéristiques sont répertoriées dans le **tableau 5** :

- Les adénovirus (Ad).
- Les virus adéno-associés (AAV).
- Les lentivirus (LV).

Tableau 5 : Principales caractéristiques des principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique en neurosciences.

	Ad	AAV	LV
Génome	ADN double brin	ADN simple brin	ARN double brin
Intégration au génome de l'hôte	Non intégratif	Non intégratif	Intégratif
Capacité	Large (20 Kb)	Limitée (<5 Kb)	Modérée (8 Kb)
Diamètre	60 à 90nm	25nm	Plus de 100nm
Tropisme neuronal	Bon	Bon à très bon, selon les sérotypes	Très bon après pseudotypage VSV-G
Diffusion	Peu documentée	Bonne (quelques mm)	Locale autour du site d'injection
Transcription	Tardive	Retardée (2-3 semaines)	Très rapide (Quelques heures)

Stabilité	Expression transitoire	Expression à long terme	Expression à long terme
Toxicité	Immunogénicité importante	Très faible	Faible

Le choix du vecteur viral pour une étude se fait selon son tropisme, sa toxicité, sa capacité d'intégration au génome, sa durée d'expression mais aussi selon le/les gènes d'intérêts, les cellules ciblées et le plan expérimental.

5.2. Les thérapies géniques dans le cadre de la maladie de Parkinson

Il existe actuellement trois principales stratégies de thérapie génique à l'essai dans le cadre de la MP (Figure 38) :

- Les thérapies géniques qui visent à **moduler l'activité des ganglions de la base** en injectant le gène encodant l'enzyme glutamate décarboxylase (GAD) responsable de la conversion du L-glutamate en acide gamma aminobutyrique (GABA) dans le noyau sous-thalamique.
- Les thérapies géniques qui visent à **ralentir la dégénérescence des neurones dopaminergiques** de la substance noire et leurs projections striatales en injectant des gènes encodant pour des facteurs trophiques tels que le glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) ou la neurturine.
- Les thérapies géniques qui visent à **augmenter le niveau de dopamine** striatale en injectant des gènes encodant pour des enzymes nécessaires à la synthèse de la dopamine.

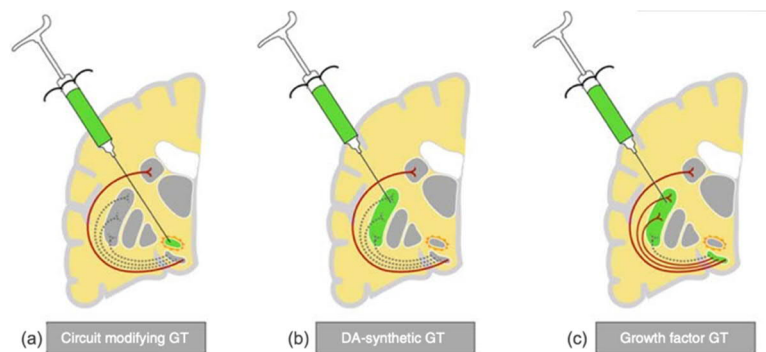


Figure 38 : Rationnel des différentes stratégies de thérapie génique à l'essai dans le cadre de la maladie de Parkinson. D'après (Buttery & Barker, 2020).

A) Modulation de l'activité des ganglions de la base par injection du gène codant pour l'enzyme GAD dans le NST afin d'inhiber son activité. **B)** Augmentation de la production de dopamine par injection des gènes codant pour les enzymes nécessaires à la synthèse de dopamine dans le putamen. **C)** Protection des neurones dopaminergiques et leurs terminaisons par injection de gènes codant pour des facteurs trophiques dans le putamen. GT = gene therapy.

5.2.1. Modulation de l'activité des ganglions de la base par surexpression locale de l'enzyme GAD dans le NST

Le principe est le même que pour la DBS. Lors de la maladie de Parkinson, l'activité du noyau sous-thalamique est augmentée. Cette suractivité va avoir pour conséquence indirecte de réduire l'activité corticale, ce qui va être à l'origine des symptômes de la maladie. En limitant l'activité du NST on peut donc traiter les symptômes de la maladie.

Les toutes premières injections dans le NST ont été faites avec de la lidocaïne, un anesthésiant local qui inhibe les canaux sodiques, ou avec le muscimol, un agoniste des récepteurs GABA. Ces injections ont eu des effets thérapeutiques mais uniquement transitoires (Levy et al., 2001). Les recherches se sont par la suite portées sur la GAD qui est l'enzyme limitante de la production du neurotransmetteur inhibiteur GABA. L'augmentation des taux de GAD dans le NST permet d'augmenter la production locale de GABA et donc d'inhiber localement son activité. L'injection unilatérale d'AAV-GAD dans le NST a donné des résultats thérapeutiques prometteurs chez le rongeur et le primate (Emborg et al., 2007; Luo et al., 2002). En effet, ces études ont démontré une bonne tolérance de la thérapie, une diminution effective de l'hyperactivité du NST et une amélioration des symptômes moteurs. Les essais cliniques qui ont suivis et leurs principaux résultats sont résumés dans le **tableau 6**. La compagnie MeiraGTX a annoncé qu'elle devrait bientôt reprendre un essai de phase II.

Tableau 6 : Principaux résultats des essais cliniques ayant utilisé la surexpression virale de l'enzyme GAD au niveau du NST dans le cadre de la maladie de Parkinson.

Auteurs	Protocole	Résultats
(Kaplitt et al., 2007) (Feigin et al., 2007)	<u>Essai ouvert non randomisé de phase I</u> Injection unilatérale d'un AAV-GAD au niveau du NST à différentes doses (1×10^{11} vg/ml, 3×10^{11} vg/ml et 1×10^{12} vg/ml) chez 12 patients sévèrement atteints.	A 12 mois : Bonne tolérance, pas d'effets adverses. Diminution du métabolisme du NST et augmentation de celui des régions corticales (TEP 18F-FDG). Amélioration des symptômes moteurs (UPDRS réduit de 24% OFF et 27% ON).
(LeWitt et al., 2011) (Niethammer et al., 2017) Interrompu pour causes financières	<u>Essai en double aveugle randomisé avec contrôles sham de phase II</u> Injection bilatérale d'un AAV-GAD au niveau du NST (1×10^{12} vg/ml) chez 45 patients sévèrement atteints.	A 6 mois : Bonne tolérance, pas d'effets adverses. Diminution du métabolisme du NST et augmentation de celui des régions corticales (TEP 18F-FDG). Amélioration des symptômes moteurs (UPDRS réduit de 23% OFF vs 13% pour les sham). Effets persistants à 12 mois.

5.2.2. Stratégies de neuroprotection des neurones dopaminergiques

Les facteurs neurotrophiques permettent d'augmenter le développement, la survie et le maintien des neurones. Ces facteurs sont réduits dans le cerveau lors de la maladie de Parkinson. Il existe de nombreux facteurs trophiques (Nurr1, CDNF, BDNF, VEGF...) mais les neurones dopaminergiques de la SN sont particulièrement sensibles au GDNF et à son analogue la neurturine (Airaksinen & Saarma, 2002; Collier & Sortwell, 1999). Afin de ralentir la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN et leurs afférences, il a donc été proposé de surexprimer, au niveau de la SN et/ou du putamen, les gènes codant pour ces deux facteurs neurotrophiques.

Le GDNF

Lors des premiers essais cliniques, le GDNF était directement infusé sous forme de protéine dans les ventricules ou dans le putamen à l'aide d'une pompe et d'un cathéter implanté (Gill et al., 2003; Lang et al., 2006; Love et al., 2005; Nutt et al., 2003; Patel et al., 2005). Cette stratégie a été abandonnée car elle n'était pas assez efficace et générait des problèmes de sureté (Kirik, Cederfjall, Halliday, & Petersen, 2017). Ces problèmes ont été résolus par l'utilisation de vecteurs viraux. De nombreuses études précliniques ont donc évalué la sureté et l'efficacité de l'injection de LV ou d'AAV codant pour le GDNF au niveau du putamen ou de la SN chez des modèles rongeurs (Y. H. Chen et al., 2008; Lu-Nguyen et al., 2014; Y. Y. Tian et al., 2007), puis chez le primate (Eberling et al., 2009; Kells et al., 2010; Kordower et al., 2000; Palfi et al., 2002; Su et al., 2009). Il a ainsi été démontré que cette thérapie est bien tolérée, améliore la survie des neurones dopaminergiques, augmente le métabolisme du striatum et améliore les symptômes moteurs chez les modèles animaux. Cette stratégie fut un moment abandonnée au profit des essais avec la neurturine (abordé dans le prochain paragraphe). Les essais cliniques qui ont suivis sont répertoriés dans le **tableau 8**.

Tableau 7 : Principaux résultats des essais cliniques ayant utilisé la surexpression virale du facteur neurotrophique GDNF au niveau du putamen dans le cadre de la maladie de Parkinson.

Auteurs	Protocole	Résultats
(Heiss et al., 2019) NINDS (identifiant NCT01621581)	<u>Essai de phase I</u> Injection bilatérale d'un AAV-GDNF au niveau du putamen à différentes doses (9×10^{10} vg/ml, 3×10^{11} vg/ml et 9×10^{11} vg/ml) chez 13 patients sévèrement atteints.	Bonne tolérance, pas d'effets adverses. Putamen couvert à 26%. Augmentation observée en TEP 18F-DOPA. UPDRS stable. Deuxième partie en cours sur 24 patients
Brain Neurotherapy Bio, Inc (identifiant NCT04167540)	<u>Essai de phase Ib</u> Injection bilatérale d'un AAV-GDNF au niveau du putamen chez 6 patients modérément atteints et 6 patients sévèrement atteints.	En cours

La neurturine

La sûreté et l'efficacité de l'infusion dans le putamen du gène codant pour la neurturine a d'abord été validée chez des modèles rongeurs (Biju et al., 2013; Gasmi, Brandon, et al., 2007; Gasmi, Herzog, et al., 2007; Herzog et al., 2013), puis chez le primate (Herzog et al., 2009; Herzog et al., 2008; Herzog et al., 2007; Kordower et al., 2006). Il a ainsi été démontré que cette thérapie est bien tolérée, améliore la survie des neurones dopaminergiques de façon dose dépendante, et améliore certains symptômes de la maladie chez les modèles animaux. Le premier essai clinique de phase I injectant un AAV-neurturine bilatéralement dans le putamen (Ceregene – CERE-120) donna des résultats encourageants. En revanche, la phase II qui suivie n'a pas atteint ses objectifs puisque aucune différence significative n'a été observée entre le groupe avec traitement et les contrôles à 12 mois (quelques effets plus prononcés ont cependant été observés à partir de 18 mois). Une des hypothèses expliquant ce manque d'efficacité est que le transport rétrograde de la neurturine jusqu'à la SN n'était peut-être pas assez robuste. Pour contrer ce manque d'efficacité, l'injection simultanée de CERE-120 à la fois dans le putamen et dans la SN a été testée chez des modèles rongeur et primate. Ces études ont prouvé la sûreté et l'efficacité de cette stratégie (Bartus, Herzog, et al., 2011). Un essai clinique a été conduit avec ce nouveau protocole d'injection et avec une concentration virale quatre fois supérieure aux précédents essais cliniques. Cette thérapie a été validée en termes de sûreté et d'efficacité et un essai de phase II a suivi. Encore une fois, aucune différence significative n'a été observée entre le groupe traitement et le groupe contrôle. Les essais cliniques et leurs principaux résultats sont résumés dans le **tableau 7**.

Tableau 8 : Principaux résultats des essais cliniques ayant utilisé la surexpression virale du facteur neurotrophique neurturine au niveau du putamen et/ou de la SN dans le cadre de la maladie de Parkinson.

Auteurs	Protocole	Résultats
(Marks et al., 2008) (Marks et al., 2010)	<u>Essai ouvert de phase I</u> Injection bilatérale de CERE-120 au niveau du putamen à différentes doses ($1,3 \times 10^{11}$ vg/ml et $5,4 \times 10^{11}$ vg/ml) chez 12 patients.	A 12 mois : Bonne tolérance, pas d'effets adverses. Amélioration des symptômes moteurs (UPDRS réduit de 36% OFF). Pas de changement en TEP 18F-DOPA.
(Bartus, Brown, et al., 2011; Bartus, Herzog, et al., 2011; Bartus et al., 2015)	<u>Essai en double aveugle randomisé avec contrôles sham de phase II</u> Injection bilatérale de CERE-120 au niveau du putamen ($5,4 \times 10^{11}$ vg/ml) chez 58 patients.	A 12 mois : Bonne tolérance, pas d'effets adverses. Pas d'amélioration significative des symptômes comparé aux shams. Pas assez d'expression au niveau de la SN.
(Bartus et al., 2013)	<u>Essais ouverts de phase I</u> Injection bilatérale de CERE-120 au niveau du putamen et de la SN à différentes doses (4×10^{11} vg/ml dans la SN et $5,4 \times 10^{11}$ vg/ml ou 24×10^{11} vg/ml ou	A 2 ans : Bonne tolérance, pas d'effets adverses.

	2x10 ¹² vg/ml) chez 6 patients modérément atteints.	
(Warren Olanow et al., 2015) (Chu, Bartus, Manfredsson, Olanow, & Kordower, 2020)	<u>Essais en double aveugle randomisé avec contrôles sham de phase II</u> Injection bilatérale de CERE-120 au niveau du putamen et de la SN (4x10 ¹¹ vg/ml dans la SN et 2x10 ¹² vg/ml dans le putamen) chez 51 patients sévèrement atteints.	A 2 ans : Bonne tolérance, pas d'effets adverses. Pas d'amélioration significative des symptômes comparé aux shams.

Que ce soit pour la neurturine ou le GDNF, les résultats très prometteurs dans les modèles précliniques n'ont pas été prédictifs des résultats des essais cliniques. Le manque de diffusion de ces facteurs neurotrophiques (moins de 15% de couverture dans le putamen lors de l'analyse histologique d'un cerveau de patient de la dernière étude de phase II avec la neurturine), l'effet placebo et le stade très avancé des patients ont été évoqués comme raisons potentielles de ce manque d'efficacité. La surexpression de facteurs neurotrophiques pourrait être une stratégie intéressante à tester plus tôt dans la maladie. De plus, l'alpha-synucléine (dont la production est augmentée chez les patients) régule à la baisse le facteur de transcription Nurr1, nécessaire au bon fonctionnement de certains facteurs neurotrophiques (Decressac, Kadkhodaei, et al., 2012). Or, les études précliniques utilisent le plus souvent des modèles induits par des neurotoxines dans lesquels la pathologie alpha-synucléine reste peu importante. Ceci pourrait expliquer la grande efficacité de ces thérapies chez les modèles animaux et le peu de prédictivité par comparaison avec la situation clinique. Cette hypothèse semble se vérifier dans une étude menée dans un modèle de surexpression de l'alpha-synucléine chez le rongeur chez lequel la surexpression de GDNF ne s'avère pas efficace (Decressac, Kadkhodaei, et al., 2012). Dans le futur, une solution serait peut-être de co-injecter ces thérapies géniques avec des agonistes Nurr1 (Kambey et al., 2021). D'autres essais utilisant d'autres facteurs neurotrophiques non-dépendants de Nurr1 sont également à l'essai (IGF, BDNF, CDFN).

5.2.3. Augmentation du taux de dopamine

Une autre stratégie de thérapie génique vise à surexprimer au niveau du striatum les gènes codant pour les enzymes nécessaires à la biosynthèse de la dopamine, ceci dans le but d'augmenter la production locale du neurotransmetteur et d'améliorer ainsi les symptômes de la maladie. Comme évoqué dans l'introduction, seule la présence de deux enzymes (TH et AADC), et celle d'un cofacteur (CH1), sont nécessaires pour la production de dopamine dans le cerveau. Plusieurs constructions géniques faisant appel à différentes associations de ces molécules ont été testées en préclinique jusqu'à présent. Les premières stratégies ont utilisé des injections striatales de vecteurs viraux codant pour la TH (AAV-TH) (Kaplitt et al., 1994) ou pour le couple TH-AADC (AAV-TH-AADC) (Sun et al., 2003) chez des rats 6-OHDA et chez le vervet MPTP (During et al., 1998). Ces stratégies ont été abandonnées car elles n'ont pas induit d'effet thérapeutique. L'injection d'un AAV-TH-CH1 dans le striatum a également été testée chez le rat 6-OHDA, démontrant un certain effet thérapeutique (Bjorklund, Bjorklund, & Kirik, 2009; T. Carlsson et al., 2005; Kirik et al., 2002; R. J. Mandel et al., 1998). Les deux stratégies ayant eu le plus d'effets

thérapeutiques en préclinique et qui sont actuellement évaluées en clinique sont l'injection de l'enzyme AADC seule ou la co-injection des deux enzymes AADC, TH et le co-facteur CH1.

L'enzyme AADC seule

L'enzyme AADC convertit la L-DOPA en dopamine. L'injection de cette enzyme au niveau du striatum du patient parkinsonien permet donc d'améliorer la conversion de la L-DOPA exogène, provenant des traitements pharmacologiques, en dopamine. Ainsi, la quantité de L-DOPA administrée aux patients peut être réduite, tout en conservant une même efficacité thérapeutique. En réduisant les traitements L-DOPA, les effets indésirables qui leur sont associés sont également réduits, ce qui représente un vrai bénéfice supplémentaire pour le patient.

La sûreté et l'efficacité de l'injection d'un AAV-AADC au niveau du putamen ont d'abord été démontrées chez des modèles rongeurs (W. Y. Lee, Lee, Jeon, Kang, & Park, 2006; Sánchez-Pernaute, Harvey-White, Cunningham, & Bankiewicz, 2001; Sanftner et al., 2006). Dans la première étude chez le primate MPTP, il a été observé que l'injection bilatérale d'un AAV-AADC dans le putamen aboutit à une bonne expression du transgène, une augmentation de l'activité métabolique de l'AADC détectable par TEP 18F-FMT, une meilleure réponse à la L-DOPA (10 à 20 fois meilleure), un besoin en médication réduit et une amélioration des symptômes moteurs (Bankiewicz et al., 2000; Bankiewicz et al., 2006; Hadaczek et al., 2010). Par la suite, une étude de dose a été faite chez le primate MPTP permettant de déterminer la dose minimale de vecteur viral nécessaire à une augmentation significative de l'activité AADC (Forsayeth et al., 2006). Suite à ces résultats prometteurs en préclinique, plusieurs essais cliniques ont été lancés. Ces essais cliniques et leurs principaux résultats sont résumés dans le **tableau 9**.

Tableau 9 : Principaux résultats des essais cliniques ayant utilisé la surexpression virale de l'enzyme AADC au niveau du putamen dans le cadre de la maladie de Parkinson.

Auteurs	Protocole	Résultats
(Eberling et al., 2008) (Christine et al., 2009) (Valles et al., 2010) (Mittermeyer et al., 2012)	<u>Essai ouvert de phase I</u> Injection bilatérale d'un AAV-AADC au niveau du putamen à différentes doses (3×10^{11} vg/ml et 9×10^{10} vg/ml) chez 10 patients modérément atteints.	A 6 mois : Bonne tolérance, pas d'effets adverses. Amélioration des symptômes moteurs (UPDRS OFF réduit de 36%). Réduction des besoins en L-DOPA, plus de temps en ON et moins en OFF. Plus forte augmentation de l'activité de l'AADC dans le putamen pour la plus forte dose (TEP 18F-FMT +75%) A 4 ans : L'activité de l'AADC reste stable. Détérioration lente des scores UPDRS.
(Muramatsu et al., 2010)	<u>Essai ouvert de phase I</u> Injection bilatérale d'un AAV-AADC au niveau du putamen (3×10^{11} vg/ml) de 6 patients modérément ou sévèrement atteints.	A 6 mois : Amélioration des symptômes moteurs (UPDRS réduit de 46% OFF). A 2 ans : Bonne tolérance, pas d'effets adverses.

		Augmentation de l'activité de l'AADC (TEP 18F-FMT +56%).
(Christine et al., 2019) (Nutt et al., 2020) (Identifiant NCT01973543)	<u>Essai ouvert non randomisé de phase I</u> Injection bilatérale d'un AAV-AADC (VY-AADC01) au niveau du putamen à différentes doses (7.5×10^{11} vg/ml, 1.5×10^{12} vg/ml et 4.7×10^{12} vg/ml) chez 15 patients sévèrement atteints.	A 6 mois : Bonne tolérance, pas d'effets adverses. Meilleure couverture pour la dose la plus élevée (42%). Augmentation de l'activité AADC plus forte pour la dose la plus élevée (TEP 18F-FMT +79%). Amélioration des symptômes moteurs. Réduction des besoins en L-DOPA (-42%) et des LIDs. Évaluation à long terme toujours en cours.
Nerocrine Biosciences (Identifiant NCT035622494)	<u>Essai en double aveugle randomisé avec contrôles sham de phase II (RESTORE-1)</u> Injection bilatérale d'un AAV-AADC (VY-AADC02) au niveau du putamen chez 85 patients modérément atteints.	Cet essai a été suspendu sur le plan clinique par la FDA (Food and Drug Administration). Cette suspension fait suite à un INDSR (Investigational New Drug Safety Report) de Neurocrine Biosciences révélant la présence d'anomalies sur les IRMs de certains patients de l'étude. L'impact clinique de ces observations est encore en cours d'investigation.
Jichi Medical University (identifiant NCT02418598)	<u>Essai ouvert de phase I/II</u> Injection bilatérale d'un AAV-AADC au niveau du putamen à différentes doses (3×10^{11} vg/ml et 9×10^{11} vg/ml) chez des patients modérément atteints.	En cours

La surexpression de l'AADC dans le putamen permet donc d'améliorer les symptômes de la maladie et de réduire les besoins en L-DOPA mais ne remplace pas l'usage de cette pharmacothérapie car l'administration de L-DOPA est nécessaire au fonctionnement de la thérapie génique. La production de dopamine n'est donc pas continue et suit l'administration de la L-DOPA. Les effets de fluctuations pourraient même être accentués du fait d'une haute activité de l'AADC.

Les enzymes AADC, TH et CH1

Pour satisfaire aux besoins en L-DOPA exogène, il est également possible de co-injecter, en plus de l'AADC, les enzymes nécessaires à la production de la L-DOPA, c'est-à-dire la TH et le CH1. Le but est de réduire au maximum les traitements à la L-DOPA intermittente afin d'avoir une production de dopamine en continue. La taille de ces trois gènes excédant la capacité de stockage d'un AAV il existe deux options : soit co-injecter trois AAV codants chacun pour un des trois gènes, soit utiliser un seul lentivirus dont la capacité de clonage est supérieure à celle des AAVs et capable d'embarquer les trois gènes dans une

même construction (stratégie tricistronique). Les deux stratégies ont été testées chez le rongeur dans un premier temps et corrigent les symptômes moteurs (Azzouz et al., 2002; Y. Shen et al., 2000; Sun et al., 2003).

L'injection unilatérale d'un mélange d'AAV-TH, d'AAV-AADC et d'AAV-GCH1 dans le noyau caudé de marmosets MPTP a démontré une bonne tolérance, une augmentation de la production de dopamine, une amélioration des symptômes et une expression persistante des transgènes jusqu'à 15 ans (Muramatsu et al., 2002). Cependant, l'utilisation de plusieurs AAVs ne garantit pas la transduction des trois vecteurs viraux dans une même cellule et donc la co-expression des transgènes dans une même cellule, ce qui serait la stratégie la plus efficace.

Les effets de l'injection bilatérale dans le putamen d'un LV tricistronique codant pour les trois gènes AADC-TH-CH1 développé par Oxford BioMedica ont été évalués chez des macaques MPTP il y a quelques années à MIRcen. Cette thérapie a permis une amélioration de la production de la dopamine au niveau du putamen (+50% comparé aux singes contrôles) et une amélioration des symptômes moteurs de façon dose dépendante (Jarraya et al., 2009). Un premier essai clinique de phase I a été lancé pour tester la sûreté et l'efficacité clinique de ce vecteur viral appelé Prosavin®. Cette étude a prouvé que cette approche thérapeutique est bien tolérée, est capable d'augmenter l'occupation des récepteurs dopaminergiques par une dopamine endogène néoformée (effet dose dépendant en TEP sur la fixation de 11C-Raclopride), réduit le score UPDRS OFF des patients de 12 points en moyenne et diminue les besoins en médication de façon générale (Palfi et al., 2018; Palfi et al., 2014). L'essai toujours en cours d'analyse pour étudier les bienfaits à long terme de cette thérapie montre déjà la persistance des effets thérapeutiques jusqu'à cinq ans post-injection (Palfi et al., 2018). Malgré l'amélioration des symptômes moteurs, le manque de différence statistiquement significative entre les différentes cohortes/doses, suggère qu'il est possible d'optimiser le rendement du vecteur viral. Afin de produire plus de dopamine, le vecteur viral Prosavin® a été modifié par la fusion des gènes de la TH et du CH1 en utilisant une séquence de liaison flexible GS15 et par le déplacement du gène de l'AADC en aval d'une séquence IRES. Ce nouveau vecteur viral, appelé AXO-LENTI-PD®, a une capacité de production de L-DOPA et de dopamine dix fois supérieure à celle de Prosavin® (Stewart et al., 2016). La sûreté et l'efficacité de l'injection de ce nouveau vecteur viral au niveau du putamen a été testée chez le macaque MPTP à différentes doses à MIRcen. Il a été observé une augmentation de l'activité de l'AADC (TEP 18F-FMT) et une amélioration des scores cliniques et de l'activité locomotrice surtout pour le groupe ayant reçu la plus forte dose de vecteur viral (Badin et al., 2019). J'ai personnellement participé aux analyses histologiques de cette étude. Cette thérapie génique est actuellement en essai clinique. Ces essais cliniques et leurs principaux résultats sont résumés dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Principaux résultats des essais cliniques ayant utilisé la surexpression virale des enzymes AADC, TH et CH1 au niveau du putamen dans le cadre de la maladie de Parkinson.

Auteurs	Protocole	Résultats
(Palfi et al., 2014) (Palfi et al., 2018)	<u>Essai ouvert de phase I/II</u> Injection bilatérale de Prosavin® au niveau du putamen à des doses différentes ($1,9 \times 10^7$, 4×10^7 et 1×10^8 TU) chez 15 patients sévèrement atteints.	A 12 mois : Bonne tolérance, pas d'effets adverses. Amélioration des symptômes moteurs (UPDRS OFF réduit de 12 points). Réduction des besoins en L-DOPA. Réduction de la disponibilité des récepteurs dopaminergiques (TEP 11C-Raclopride).

(Identifiant NCT01856439)		A deux ans : Amélioration des symptômes moteurs qui persiste. Évaluation à long terme toujours en cours.
Sio Gene Therapies (Identifiant NCT03720418)	<u>Phase I/II (SUNRISE-PD)</u> Parti a : essai ouvert Injection bilatérale de AXO-LENTI-PD® au niveau du putamen à différentes doses (4.2×10^6 vg/ml et 1.4×10^7 vg/ml) chez des patients sévèrement atteints. Parti b : essai randomisé en double aveugle Passage à 32 patients modérément atteints.	En cours Chez les deux premiers patients à 6 mois : Amélioration des symptômes moteurs (UPDRS OFF réduit de 21 points). Réduction des besoins en L-DOPA. Chez le premier patient à 12 mois : Amélioration des symptômes moteurs (UPDRS OFF réduit de 23 points).

L'injection d'un lentivirus-AADC-TH-CH1 dans le putamen permet donc la production de dopamine en continue, ce qui améliore les symptômes moteurs de la maladie et permet de réduire les besoins en L-DOPA et ses effets indésirables, notamment dû aux fluctuations.

L'ensemble des thérapies géniques exposées ici ont montré des résultats prometteurs en clinique jusqu'à présent, notamment dans l'amélioration des symptômes moteurs sur le long terme. Au vu de leur sûreté et efficacité, ces stratégies vont probablement s'ouvrir à un plus grand nombre de patients dans les années à venir. Cependant ces thérapies demeurent intrinsèquement invasives et irréversibles et s'adressent pour l'instant uniquement à des patients à des stades avancés, L-DOPA répondeurs et souffrant d'effets néfastes après plusieurs années de traitements pharmacologiques.

Puisque les thérapies géniques sont irréversibles et non modulables il serait souhaitable des pouvoir les contrôler pour plus de sûreté et pour idéalement pouvoir s'adapter aux besoins des patients qui sont hétérogènes et qui évoluent au fur et à mesure de la progression de la maladie. Une alternative serait de développer des systèmes de régulation permettant d'ajuster l'expression des transgènes à la demande et reproduire un tonus dopaminergique plus physiologique et adapté à chaque patient. Il serait ainsi possible de doser la quantité de dopamine souhaitée pour chaque sujet dans le temps, selon la sévérité et le stade de la pathologie.

Plusieurs systèmes de régulation de thérapie génique sont actuellement en essai utilisant différentes constructions dont la rapamycine, le represseur de l'opérateur lac, les récepteurs stéroïdiens ou encore les RNAi et les aptamères (Naidoo & Young, 2012). Le système de régulation le plus connu est celui utilisant la tétracycline qui peut activer ou inactiver la transcription de gènes dans le cadre de thérapie génique dans le cerveau (Corti et al., 1999; Georgievska et al., 2004; Manfredsson et al., 2009). Ce système a déjà été utilisé pour la régulation de l'expression de GDNF chez des rats sains (Georgievska et al., 2004). Récemment, l'équipe de Espadas-Alvarez a utilisé une méthode de transfection appelée neurotensin-polypex qui permet d'activer la transduction de GDNF dans les neurones dopaminergiques via l'administration de tétracycline chez des rats parkinsoniens (Espadas-Alvarez et al., 2017). Une étude chez le rat parkinsonien a testé et validé l'efficacité d'une thérapie génique régulable visant à restaurer l'activité locomotrice spontanée par surexpression d'un AAV-TH et un AAV-CH1 dans le striatum

(Cederfjall, Broom, & Kirik, 2015; Iwamoto, Bjorklund, Lundberg, Kirik, & Wandless, 2010). Dans cette approche, l'enzyme CH1 est couplée avec la déhydrofolate réductase déstabilisée (DD) qui est constitutivement éliminée par le protéasome. Le triméthopime (TMP) est un antibiotique capable de traverser la BHE et de se lier à la DD. En se liant à la DD, le TMP empêche son élimination par le protéasome et permet ainsi l'expression de l'enzyme CH1 qui produit à son tour le cofacteur BH4, lui-même activateur de l'enzyme TH. Ce dessin expérimental permet l'expression constitutive de la TH et l'expression contrôlée du CH1. Dans cette étude, les auteurs ont observé une régulation de la production de la L-DOPA en fonction de la dose de TMP et une amélioration des symptômes moteurs chez des rats parkinsoniens.

5.3. Évaluation d'une thérapie génique régulable chez le primate non-humain MPTP

Sur la base de ces résultats prometteurs chez le rat, l'évaluation de la sûreté et de l'efficacité de l'injection d'un AAV-TH et d'un AAV-DD-CH1 régulable dans le striatum de 8 PNH parkinsoniens a été réalisée au laboratoire en collaboration avec Deniz Kirik et son équipe de l'Université de Lund. Cette première étude pilote avait débutée avant mon arrivée au laboratoire, cependant j'ai pu participer aux expériences sur le dernier groupe de primates (groupe 4).

Les objectifs de cette première partie de l'étude pilote étaient :

- 1) D'établir une dose d'antibiotique TMP qui soit sûre et assez efficace pour activer l'expression de l'enzyme CH1. Pour cela, différentes doses orales de TMP ont été testées suite à l'injection de différents vecteurs viraux (groupe 1).
- 2) De démontrer qu'il est possible de contrôler l'expression d'un gène *in vivo* chez le primate grâce à l'administration de cet antibiotique. Pour cela, différentes constructions virales et titres viraux ont été testés pour optimiser l'expression des transgènes (groupes 2 et 3).
- 3) D'évaluer l'efficacité thérapeutique de cette stratégie de thérapie génique chez le primate non-humain (groupe 4).

Les différents groupes d'injection sont détaillés dans le **tableau 11**.

Tableau 11 : Groupes d'injection de la première partie de l'étude pilote sur l'évaluation d'une thérapie génique régulable chez le primate MPTP.

Group	Number of macaques	Viral vector construct	AAV dose (gc/ml)	Injection sites	Volume/site (µL)	TMP dose (mg/kg)	TMP administration mode
1	2	TH + DD-GCH1	1,06.10 ¹⁴	Caudate : CA+5 & CA+1 Putamen CA & CA-4	20	5, 10 and 20	Oral
2	1	DD-GCH1	1,19.10 ¹⁴	Caudate : CA+4 & CA+1 Putamen CA & CA-4	20	-	-
	1		3,79.10 ¹³			20	Oral
3	1	TH + GCH1	2,12.10 ¹⁴	Caudate : CA+4 & CA+1 Putamen CA & CA-4	20	-	-
	1	tTH + GCH1	2,43.10 ¹⁴				
4	2	DD-tTH-GCH1	1,06.10 ¹⁴	Caudate : CA+4 & CA+1 Putamen CA & CA-4	20	20	Oral and subcutaneous

Les résultats de cette étude pilote n'ont pas encore été publiés et vont être présentés ici succinctement.

Le 1er groupe (n=2) a été injecté avec un AAV-DD-CH1 et un AAV-TH et plusieurs doses orales de TMP ont été testées. Ces doses (5mg/kg, 10mg/kg et 20mg/kg) ont été choisies en s'inspirant des doses utilisées en clinique et en évaluant leurs effets *in vivo* sur l'activité de l'enzyme AADC (PET 18F-FMT) et sur le comportement moteur des animaux (scores cliniques et activité locomotrice). Les résultats des examens TEP réalisés après injection des vecteurs viraux et sous traitement 20mg/kg de TMP montrent une augmentation de la liaison du radioligand (FMT, un substrat de l'enzyme AADC) et donc de l'activité augmentée de l'enzyme AADC après thérapie chez un animal (**Figure 39 A**). Contrairement à ce qui avait été observé chez le rongeur, l'administration de TMP à différentes doses n'a pas eu d'influence sur le comportement locomoteur des animaux (**Figure 39 B et C**).

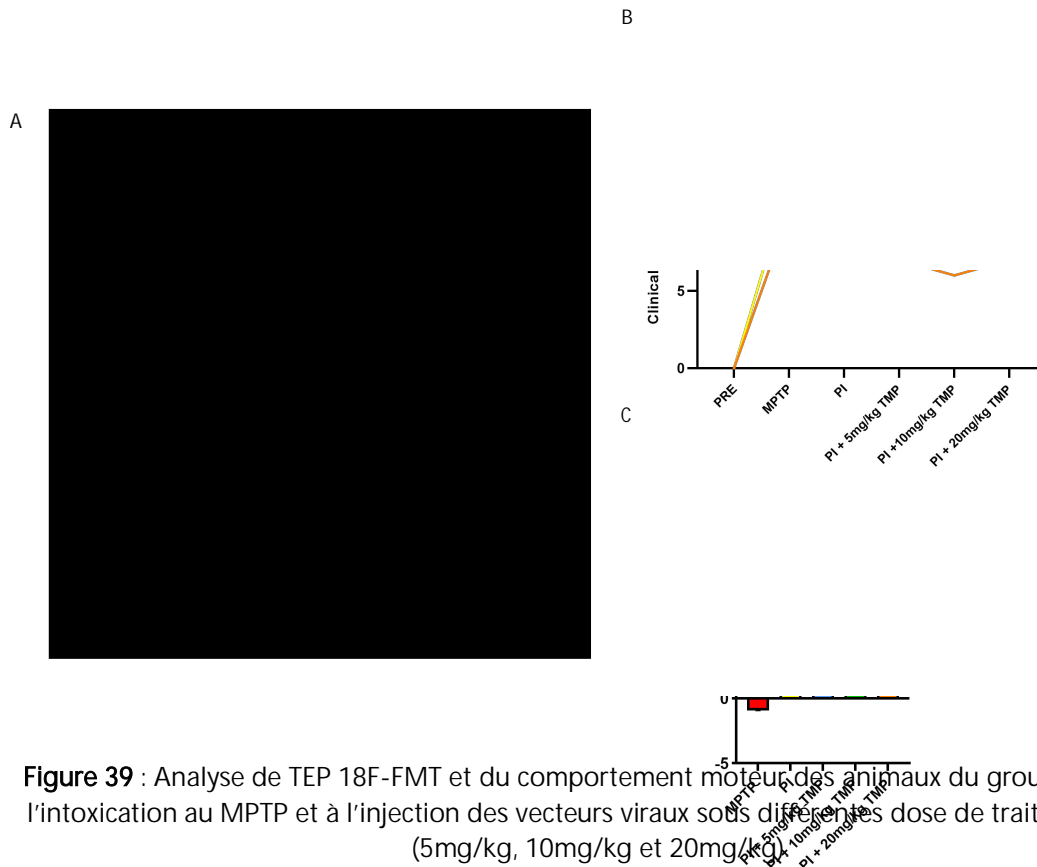


Figure 39 : Analyse de TEP 18F-FMT et du comportement moteur des animaux du groupe 1 suite à l'intoxication au MPTP et à l'injection des vecteurs viraux sous différentes doses de traitement TMP (5mg/kg, 10mg/kg et 20mg/kg).

A) Images paramétriques de TEP 18F-FMT aux temps baseline (BL), MPTP et post-injection (PI) ainsi que la différence entre les temps PI et MPTP. Les images paramétriques sont recalées sur une image anatomique IRM visible en gris. Les échelles Ki (liaison spécifique du radioligand sur l'AADC) vont du bleu (pas de fixation) au rouge (fixation maximale). **B)** Analyse des scores cliniques. PRE = score clinique à baseline, MPTP = score clinique avant l'injection des vecteurs viraux, PI = score clinique après injection des vecteurs viraux selon la dose de TMP administrée. **C)** Quantification des changements dans l'activité motrice spontanée via Ethovision. Les changements ont été calculés à partir des moyennes des trois dernières TDM (total distance moved) obtenues à chaque timepoint. Les données sont exprimées relatives à baseline (pour le timepoint MPTP) ou au stade MPTP (pour les temps post injection). PI = Post-injection.

Afin de vérifier que ce résultat négatif n'était pas dû au dysfonctionnement de la construction virale en elle-même, deux groupes d'animaux ont été ajoutés pour quantifier l'expression des transgènes du vecteur AAV-DD-CH1 d'un côté et du vecteur AAV-TH de l'autre. Pour ces deux groupes le comportement moteur *in vivo* n'a pas été évalué car les constructions n'étant pas complètes, aucune amélioration n'était attendue.

Les deux animaux du groupe 2 ont ainsi été injectés avec différentes doses d'AAV-DD-CH1 pour tester la capacité de régulation de la construction DD avec (n=1) ou sans TMP (n=1). Les analyses histologiques et biochimiques ont révélé que l'expression du transgène DD-CH1 est dépendante de la présence de l'antibiotique TMP et donc que le système de régulation est efficace (**Figure 40**). Il a également été démontré qu'à dose constante de TMP (20mg/kg), le niveau d'expression du transgène DD-CH1 est dépendant de la dose de vecteur viral injectée (**Figure 40**).

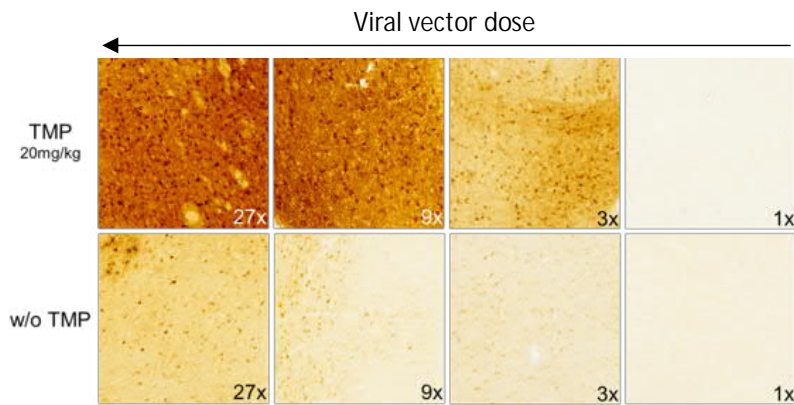


Figure 40 : Niveau d'expression du transgène DD-CH1 au niveau du striatum selon la dose de vecteur viral injectée (1x-27x) et selon l'administration ou non de TMP chez les animaux du groupe 2.

Deux autres animaux (groupe 3) ont été injectés avec un AAV-TH classique (n=1) ou modifié où la TH est tronquée (AAV-tTH, n=1). Le but de cette comparaison était de tester le niveau d'expression de l'enzyme TH dans ces deux configurations, la forme tronquée de la TH étant réputée plus active car non régulée par un excès de dopamine. Les analyses histologiques et biochimiques sont actuellement en cours chez notre collaborateur mais des résultats préliminaires ont montré que la construction AAV-tTH était plus efficace.

Pour finir, nous avons évalué chez deux animaux parkinsoniens (groupe 4), l'efficacité thérapeutique de l'injection striatale d'un AAV-DD-CH1-tTH sur le comportement locomoteur spontané. Sous TMP, aucune amélioration des symptômes moteurs n'a été observée chez ces primates pendant toute la durée de l'étude soit trois mois post-injection (3 mo PI).

Cette première étude pilote a ainsi permis de prouver que la construction génétique DD-CH1 est fonctionnelle et permet de moduler l'expression du transgène CH1 *in vivo* chez le primate via l'administration orale de l'antibiotique TMP. De plus, aucun effet indésirable n'a été observé suite à l'administration quotidienne d'antibiotique chez ces primates. Bien que le système de régulation ait été validé, nous n'avons pas observé d'amélioration robuste des symptômes moteurs lorsque les animaux étaient sous traitement antibiotique. Nous pensons que cela est dû au fait que malgré une bonne expression des transgènes TH et CH1, l'enzyme AADC est nécessaire pour observer des effets thérapeutiques robustes, et les niveaux endogènes de la AADC sont trop affectée dans le modèle MPTP sévère que nous avons utilisé. Nous avons donc décidé de poursuivre cette étude en rajoutant un vecteur viral supplémentaire exprimant l'enzyme AADC.

6. Objectifs

Le premier objectif de cette étude était d'évaluer la sûreté et l'efficacité d'une trithérapie (AAV-TH, AAV-CH1, AAV-AADC) après injection dans le striatum (putamen et caudé) de primates MPTP. Le dessin expérimental sélectionné permet de comparer les effets observés lorsque les trois transgènes sont constitutivement exprimés ou lorsqu'ils l'un d'entre eux, le CH1, est exprimé via un système de régulation DD. La co-injection des trois constructions constitutivement exprimées au niveau du striatum devait permettre la néosynthèse de dopamine par les neurones striataux transduits. En revanche, la co-injection

des trois vecteurs comprenant la construction régulable par le TMP ne devait permettre la synthèse de dopamine qu'en présence de TMP. La validation de l'efficacité thérapeutique de cette thérapie génique régulable chez le primate MPTP est nécessaire pour un possible développement clinique par la suite.

Le deuxième objectif de cette étude était d'utiliser les outils développés dans la première partie de ma thèse afin d'évaluer l'impact de cette thérapie non seulement sur les symptômes moteurs mais également sur les symptômes non-moteurs présents chez le primate MPTP.

7. Protocole expérimental

Pour cette deuxième étude pilote, trois macaques ont été intoxiqués chroniquement au MPTP jusqu'à ce qu'ils développent des symptômes parkinsoniens sévères et stables. Ils ont par la suite été traités par une stratégie de thérapie génique constitutive (n=1) ou régulable (n=2). L'efficacité de ces thérapies a été évaluée par l'analyse du comportement moteur (scores cliniques et locomotion spontanée) et du comportement non-moteur (tests cognitifs et suivi de la température corporelle) avant intoxication au MPTP, après intoxication au MPTP et après injection des différents vecteurs viraux (Figure 41). Un challenge L-DOPA a été réalisé avant et après thérapie génique, afin de vérifier que les animaux sévèrement parkinsoniens restaient néanmoins DOPA répondeurs. Une IRM anatomique a été réalisée avant la chirurgie pour déterminer les sites d'injection. Un examen PET 18F-FMT a été réalisé avant et après intoxication au MPTP pour évaluer l'activité de l'enzyme AADC. Il était prévu de réaliser cet examen après thérapie génique mais cela n'a pas pu être le cas à cause du confinement lié à la crise sanitaire du COVID19. Les animaux ont été euthanasiés neuf mois après la thérapie afin de réaliser des analyses post-mortem histologiques et biochimiques pour évaluer respectivement l'expression des transgènes et les concentrations de métabolites dopaminergiques. Ces analyses sont toujours en cours de finalisation chez notre collaborateur Deniz Kirik.

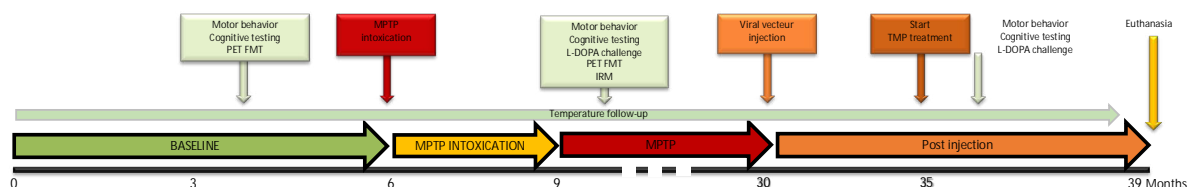


Figure 41 : Protocole expérimental de la deuxième partie de l'étude pilote portant sur l'évaluation d'une thérapie génique régulable chez le primate non-humain MPTP.

8. Matériel et méthodes

8.1. Sujets

Trois macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) mâles adultes, provenant de l'île Maurice d'âge moyen $5,8 \pm 0,8$ ans et de poids moyen $7 \pm 1,08$ kg ont participé à cette étude. Ils ont été hébergés dans les mêmes conditions que celles décrites dans la Partie I 4.1.

8.2. Intoxication au MPTP

Les trois macaques de l'étude font partie du second groupe d'intoxication au MPTP rapportés dans le chapitre précédent (Mac 6, Mac 7 et Mac 8). Les données relatives à leur intoxication au MPTP sont donc disponibles dans la Partie I 4.2.

8.3. Chirurgie

Les animaux ont été anesthésiés (kétamine 1mg/kg et xylazine 0,5mg/kg) puis maintenus sous propofol (1mg/kg/h) après intubation. La température a été maintenue à 37°C à l'aide d'une couverture chauffante et la fréquence respiratoire, la SpO₂, le EtCO₂, le rythme cardiaque et la pression sanguine ont été monitorés en continu. Les primates ont été placés dans un cadre stéréotaxique en position de sphinx. Avant l'incision de la peau, une injection d'analgésique local a été réalisée (bupivacaine 1mg/kg et xylazine avec adrénaline 2mg/kg). Un traitement antibiotique a été réalisé avant et après la chirurgie (terramycine longue action, 20mg/kg). Les vecteurs viraux ont été injectés en utilisant un micromanipulateur (Kopf, Allemagne), une micro pompe et un micro-contrôleur (KDS) et une seringue en verre Hamilton avec une aiguille stérile (26G, 50mm de long). Les animaux ont été injectés bilatéralement dans le putamen commissural et post-commissural (zone motrice) et dans la partie antérieure (pré-commissurale) du noyau caudé. Les paramètres d'injection sont détaillés dans le **tableau 12**. Les vecteurs viraux sont des AAV5 sous promoteur CBA produits par notre collaborateur Deniz Kirik à l'Université de Lund.

Tableau 12 : Groupes d'injection de la deuxième partie de l'étude pilote portant sur l'évaluation d'une thérapie génique régulable chez le primate non-humain MPTP.

Number of macaques	Viral vector construct	AAV dose (gc/ml)	Injection sites	Volume/site (µL)	TMP dose (mg/kg)	TMP administration mode
1	TH + GCH1 + AADC	1,72.10 ¹⁴	Caudate : CA+4 & CA+1 Putamen CA & CA-4	20	20	Oral
2	TH + DD-GCH1 + AADC	1,56.10 ¹⁴				

8.4. Traitement au TMP

Des chambres gastriques ont été implantées chez les deux animaux devant recevoir la thérapie régulable afin de pouvoir délivrer l'antibiotique TMP, quotidiennement, par voie orale (p.o.) et ainsi éviter un gavage quotidien aux animaux. Le traitement au TMP a débuté 5 mois après l'injection des vecteurs viraux. La dose quotidienne de TMP était de 20mg/kg. Afin que le folate présent dans l'alimentation classique des animaux ne joue pas un rôle sur la déhydrofolate réductase déstabilisée, les animaux ont reçu une alimentation sans folates après la stabilisation des symptômes parkinsoniens.

8.5. Imagerie IRM

Des images anatomiques (T2, T2*) ont été acquises avant injection des vecteurs viraux afin de déterminer précisément les sites d'injection dans le noyau caudé et le putamen dorsolatéral. Pour cela, les animaux ont été anesthésiés (kétamine 1mg/kg et xylazine 0,5mg/kg) et placés dans l'aimant en position de sphinx, fixés dans un cadre stéréotaxique IRM compatible (M2E, Villepinte, France) par des barres d'oreilles et une barre de gueule. L'imagerie IRM a été réalisée sur un scanner horizontal de 7 Tesla (Bruker) équipé d'une bobine de gradient atteignant 100 millitesla par mètre (mT/m ; temps de montée de 300 ms) et d'une bobine de surface circulaire à radiofréquence 1Hz (RAPID Biomedical, Rimplar, Allemagne). Une fois dans l'aimant, les animaux étaient chauffés à l'aide d'une couverture à eau chaude et leurs paramètres vitaux étaient surveillés à distance. Les images pondérées en T2 ont été acquises à l'aide de deux séquences d'écho de spin rapides, bidimensionnelles (2D) et à haute résolution (résolution en plan de $469 \times 469 \mu\text{m}^2$, épaisseur de coupe de 1 mm, 40 coupes) : la première séquence comprenait un temps d'écho effectif (TE) de 62 ms, un temps de répétition (TR) de 4 750 ms et un temps d'acquisition (Tacq) de 16 minutes. La deuxième séquence a été réalisée afin de délimiter les régions cérébrales sur l'image TEP co-registrée et comprenait un temps d'écho TE/ TR de 20/8000 ms, 5 échos, un TE effectif de 52,5 ms et un Tacq de 43 min. Pour les images pondérées en T2*, les paramètres utilisés étaient les suivants : Résolution en plan de $469 \times 469 \mu\text{m}^2$, épaisseur de coupe de 1 mm, 40 coupes, TE de 5 ms (de 5,5 à 30 ms), TR de 2 ms et Tacq de 8 min.

8.6. Imagerie TEP

Des examens utilisant le radioligand 18F-FMT (6-[18F] fluoro-L-m-tyrosine, substrat de l'AADC) produit par le Centre de Recherches du Cyclotron de l'Université de Liège, Belgique ont été réalisés à baseline et étaient prévus en post-injection afin d'évaluer l'activité de l'enzyme AADC et donc la restauration du système dopaminergique après thérapie génique. Les primates ont été anesthésiés (kétamine 1mg/kg et xylazine 0,5mg/kg) et placés dans un cadre stéréotaxique comme décrit précédemment pour les examens IRMs. L'imagerie TEP a été réalisée sur un scanner microPET Concorde Focus220 offrant une haute sensibilité et une haute résolution spatiale (Siemens, TN, USA). Tous les animaux ont été prétraités par une injection i.m. de benzerazide (2 mg/kg), un inhibiteur de la décarboxylase périphérique, 30 minutes avant l'imagerie. Un balayage de transmission de 17 minutes a été effectué avant l'acquisition TEP pour permettre la correction de l'atténuation, suivi d'une acquisition par émission dynamique de 120 ([18]FMT ; $164,3 \pm 19,3$ MBq). Des images TEP 18F-FMT sommées ont été créées pour permettre une bonne mise en registre (logiciel PMOD® dédié, PMOD Technologies, 3.6) avec l'imagerie IRM anatomique pondérée en T2. Les régions anatomiques d'intérêt ont été automatiquement délimitées sur les images IRM individuelles en utilisant l'atlas CIVM et le pipeline de segmentation Primatologist développé in-house pour le cerveau de macaque (Balbastre et al., 2017). Les données TEP du 18F-FMT ont été quantifiées à l'aide d'une analyse graphique à temps multiples (graphique de Patlak) précédemment décrite (Badin et al., 2019). Les données du 18F-FMT se prêtent à cette approche car ce traceur est un traceur à liaison irréversible qui atteint l'état d'équilibre relativement rapidement (Patlak et Blasberg, 1985). L'absorption a été quantifiée par la pente (Ki) de l'ajustement hautement linéaire entre la courbe de temps d'activité du striatum et la courbe de temps d'activité d'une région de référence

dans laquelle le traceur est lié de manière non spécifique, dans ce cas le cervelet. L'analyse de Patlak a fourni des estimations régionales du Ki et des images paramétriques du Ki.

8.7. Évaluation du comportement moteur

L'évaluation du comportement moteur a été réalisée comme décrite dans la partie I 4.3. Les scores cliniques et l'activité locomotrice ont été évalués toutes les trois semaines après l'injection des vecteurs viraux.

8.8. Challenge L-DOPA

Un challenge L-DOPA a été réalisé chez les primates stablement parkinsoniens et à 9 mo PI, après administration de TMP (60 minutes avant le challenge) ou sans TMP. Le but était de vérifier que les animaux étaient capables d'une réponse comportementale au traitement dopaminergique pharmacologique de référence. Les animaux ont été filmés pendant six heures après avoir reçu une dose de 30mg/kg de L-DOPA orale (Modopar®, Benserazide 25mg + Levodopa 100mg) ainsi que six heures sans administration de L-DOPA (condition parkinson non traité). La distance totale parcourue (TDM) pendant ces six heures a été analysée et les TDM sous traitement L-DOPA ont été comparées à celles observées sans traitement L-DOPA. Ces acquisitions vidéo ont été réalisées dans les mêmes conditions que lors de l'analyse de l'activité locomotrice spontanée.

8.9. Évaluation du comportement cognitif

L'évaluation du comportement cognitif a été réalisée comme décrite dans la partie I 4.4.

Deux tests cognitifs supplémentaires ont été ajoutés à baseline et après administration de la thérapie génique. Ces tests cognitifs n'ont pas été réalisés au stade MPTP pour ne pas trop alourdir la batterie de test à réaliser par les singes parkinsoniens.

8.9.1. Test de mémoire

Ce test est administré comme un contrôle de la capacité du primate à travailler, en termes de mémoire de travail, d'attention, et d'absence d'apathie, plutôt que pour l'évaluation de la mémoire à long terme qui elle, est dépendante des fonctions hippocampiques et n'est donc pas affectée dans la MP.

Au total, 60 photos sont présentées par paires de façon randomisée (**Figure 42**). Une seule des deux photos présentées à chaque essai est récompensée. Par une stratégie d'essais et erreurs l'animal doit identifier et retenir les 30 photos récompensées tout au long du test. Lorsque l'animal choisit l'image récompensée, un succès est enregistré. Lorsque l'animal choisit l'autre image, une erreur est enregistrée et lorsque l'animal commence un essai mais ne choisit pas d'image dans les 60 secondes alors un non touché est enregistré. Une session de travail est composée de 30 essais, un essai par paire d'images. A baseline les primates sont entraînés jusqu'à ce qu'ils atteignent un score de 90% de réussite sur deux sessions de suite. Le succès global est alors calculé comme étant la moyenne des pourcentages de succès

sur les quatre dernières sessions de travail, soit 120 essais. Au stade post-injection, les primates effectuent quatre sessions de travail et le succès global est calculé comme étant la moyenne des pourcentages de succès sur ces quatre sessions.

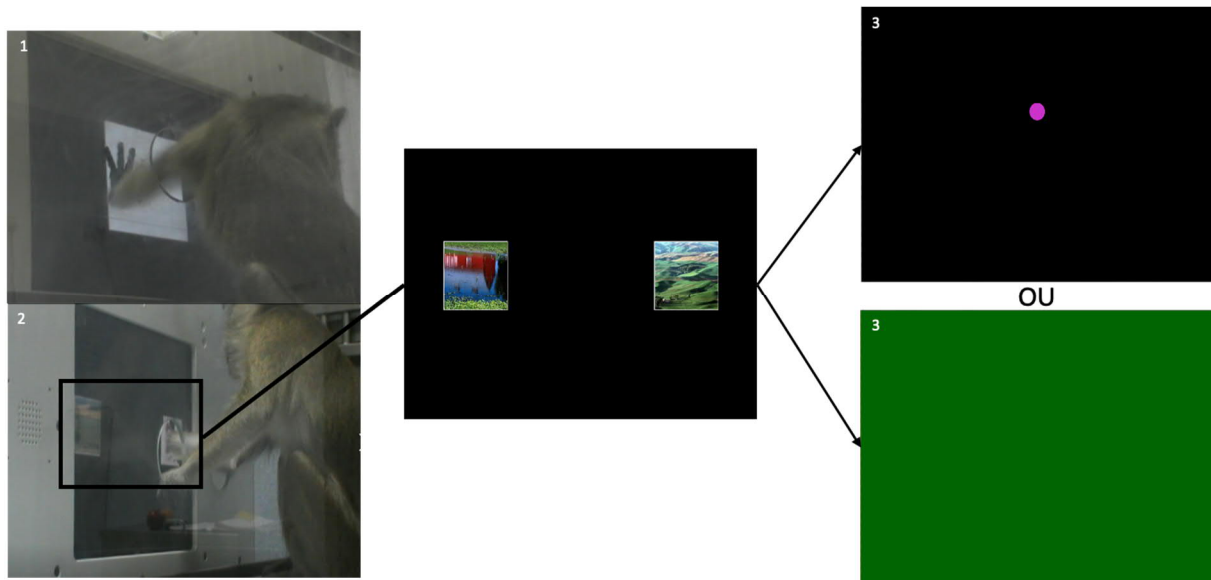


Figure 42 : Déroulement en plusieurs étapes d'un essai du test de mémoire.

1. Le singe commence par lancer le test en appuyant sur un carré blanc affiché à l'écran.
2. Il choisit une image parmi les deux images présentées.
3. S'il choisit la bonne image il obtient une récompense, sinon un fond vert apparaît à l'écran.

8.9.2. Test de mémoire spatiale

Cette tâche est inspirée des tâches d'attention focalisées et de mémoire spatiale déjà évoquées dans la partie I 1.2.1 (Fernandez-Ruiz et al., 1995; Schneider et al., 2013; Slovin et al., 1999).

Dans ce test, des cercles vides sont disposés radialement à égale distance les uns des autres (**Figure 43**, 2). Le singe doit appuyer sur un levier pour obtenir pendant un bref moment un indice indiquant le cercle qui sera récompensé ultérieurement (le cercle se remplit en blanc pendant 1s). Le primate doit alors relâcher le levier et toucher le cercle en question. Si l'animal réussit à rester appuyé sur le levier pour avoir l'indice et choisit le bon cercle, alors l'essai est enregistré comme un succès et il reçoit une récompense. En revanche, si l'animal relâche le levier avant d'avoir l'indice ou s'il choisit le mauvais cercle alors l'essai est enregistré comme une erreur. Enfin, si l'animal commence un essai mais n'appuie pas sur le levier ou ne choisit pas un cercle dans les 60 secondes, alors il est enregistré comme un non touché. Une session de travail est composée de 40 essais. A baseline les primates sont entraînés jusqu'à ce qu'ils atteignent 90% de réussite sur deux sessions de suite. Le succès global est alors calculé comme étant la moyenne des pourcentages de succès sur les quatre dernières sessions de travail, soit 160 essais. Au stade post-injection, les primates effectuent quatre sessions de travail et le succès global est calculé comme étant la moyenne des pourcentages de succès sur ces quatre sessions.

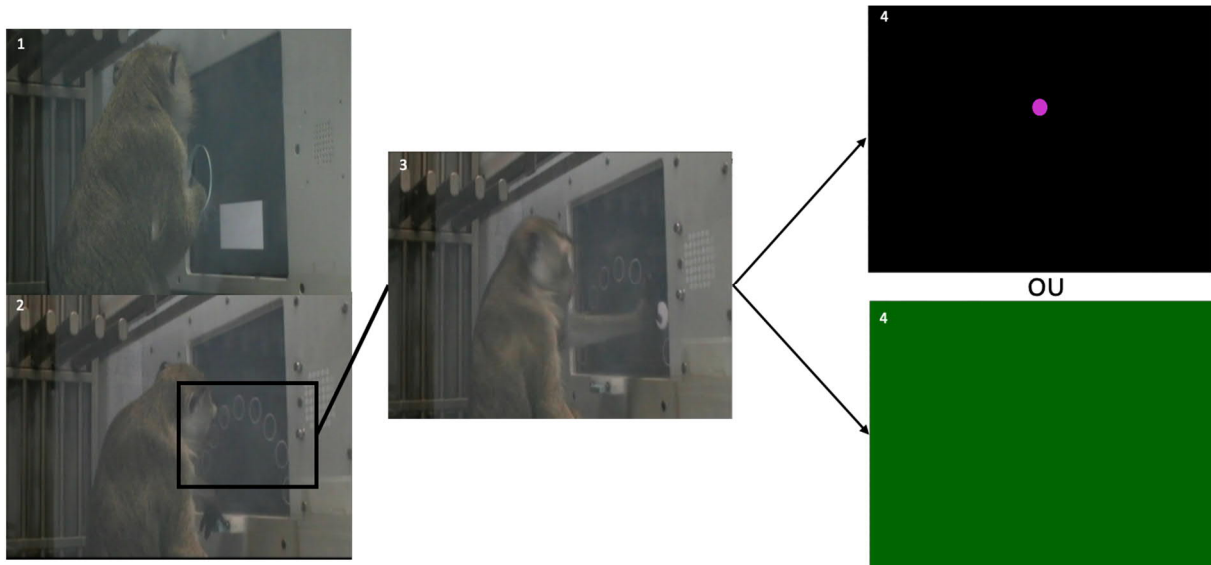


Figure 43 : Déroulement en plusieurs étapes d'un essai du test de mémoire spatiale.

1. Le singe commence par lancer le test en appuyant sur un carré blanc à l'écran.
2. Il doit appuyer sur un levier pour obtenir un indice sur le cercle récompensant parmi les neuf présentés à l'écran.
3. Il choisit un cercle parmi les neuf.
4. S'il choisit le bon cercle il obtient une récompense, sinon un fond vert apparaît à l'écran.

8.10. Évaluation du cycle activité/repos

L'évaluation du cycle activité/repos a été réalisée comme décrite dans la partie I 4.4 en utilisant les puces de température STRAR.ODDI® afin d'évaluer une possible récupération des cycles activité/repos après thérapie. Les singes ont été monitorés pendant un mois au stade stablement parkinsonien et pendant neuf mois après l'injection des vecteurs viraux. Pour les données post-injection, seuls les 4 derniers mois sous traitement au TMP ont été pris en compte pour les deux animaux injectés avec la thérapie régulable.

8.11. Analyses post-mortem

Les analyses histologiques et biochimiques sont en cours chez notre collaborateur Deniz Kirik à Lund. Elles serviront à évaluer respectivement l'expression des transgènes et les concentrations de métabolites dopaminergiques.

8.12. Analyses statistiques

Le faible nombre d'animaux inclus dans cette étude pilote ne permet pas d'effectuer des analyses statistiques.

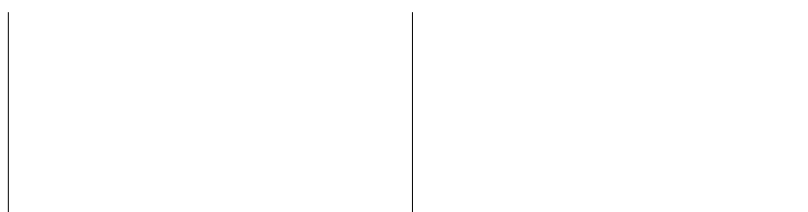
9. Résultats

9.1. Comportement moteur

Suite à l'intoxication au MPTP, les animaux ont développé des symptômes parkinsoniens stables (**Figure 44 A**). Ainsi, avant l'injection des vecteurs viraux le score clinique moyen de ces trois animaux est de 9, ce qui correspond à des symptômes parkinsoniens robustes. Suite à l'injection des vecteurs viraux, et comme attendu, le score clinique du mac8 injecté avec la thérapie constitutive, s'est amélioré progressivement pour atteindre un score de six à 5 mo PI et de quatre à 9 mo PI (fin de l'étude). Pour les mac6 et mac7, injectés avec la thérapie régulable, les scores cliniques sont restés stables à 5 mo PI, ce qui était attendu puisqu'ils n'étaient pas encore sous traitement TMP. En revanche ces scores ont diminué d'un et trois points respectivement à 9 mo PI (soit quatre mois après le début du traitement au TMP). L'injection de la thérapie génique régulable seule, sans activation par l'antibiotique, ne permet pas l'amélioration des scores cliniques, ce qui démontre la fiabilité du système de régulation. Une fois le traitement TMP administré, on observe en effet une amélioration des scores cliniques des deux animaux grâce à l'expression du co-facteur CH1 en même temps que la TH et l'AADC (constitutives). Cependant l'amélioration des scores cliniques à 9 mo PI des mac6 et mac7 reste bien moindre que pour le mac8. Cela peut être dû au fait que ces animaux n'ont eu que quatre mois de traitement TMP et donc de thérapie « active » comparée au mac8 qui a eu neuf mois de thérapie active.

Les symptômes parkinsoniens évalués avant injection des thérapies géniques par les scores cliniques sont largement en accord avec l'analyse de l'activité locomotrice spontanée qui montre que les TDM observées lors des évaluations motrices sont significativement réduites après l'intoxication au MPTP (**Figure 44 B**). Ainsi, avant l'injection des vecteurs viraux, les TDM de ces trois primates sont diminuées de 0,83 fois en moyenne comparé à baseline. Cette diminution de l'activité locomotrice n'est pas homogène entre les trois primates, car le mac8 a commencé à montrer une récupération spontanée quelques semaines avant la chirurgie. Ce mac8 (injecté avec la thérapie constitutive), présente une amélioration de son activité motrice de 1,01 fois à 5 mo PI comparée au stade parkinsonien. En revanche, cette amélioration n'a été que transitoire, l'activité motrice de ce singe ayant retrouvé son niveau MPTP, à 9 mo PI. Pour les mac6 et mac7, injectés avec la thérapie régulable, leurs TDM ont augmentées en moyenne de 0,73 fois avant le début du traitement au TMP, à 5 mo PI, et de 3,7 fois à 9 mo PI, sous traitement TMP. L'injection de la thérapie génique régulable améliore l'activité locomotrice des animaux très significativement lorsque l'expression de l'enzyme CH1 est activée par le traitement au TMP.

A



B

Figure 44 : Analyse du comportement moteur des animaux suite à l'intoxication au MPTP et l'injection des vecteurs viraux.

A) Analyse des scores cliniques. PRE = score moteur à baseline avant l'intoxication au MPTP, mo MPTP = mois post intoxication au MPTP, mo PI = mois post injection du vecteur viral. **B)** Quantification des changements dans l'activité motrice spontanée (TDM – Total distance moved) via Ethovision® au stade stablement parkinsonien (MPTP) et à 5 et 9 mois post injection (mo PI) du vecteur viral. Les changements ont été calculés à partir des moyennes des trois dernières TDM obtenues à chaque temps. Les données sont exprimées relatives à baseline (pour le temps MPTP) ou au stade MPTP (pour les temps 5 et 9 mois post injection).

Des challenges L-DOPA ont été réalisés sur les animaux parkinsoniens stables pour établir leur sensibilité à la restauration de la dopamine avant d'administrer la thérapie génique. Ces challenges servent à évaluer si les animaux sont dopa répondeurs, ce qui constitue un critère d'inclusion pour l'étude, comme lors des essais cliniques. Ensuite ce test a été répété après thérapie génique et juste avant la fin de l'étude afin de vérifier l'ampleur de l'effet du traitement L-DOPA sur l'activité locomotrice (**Figure 45**). Au stade MPTP, les TDM sont ainsi augmentées en moyenne de $10,64 \pm 2,03$ fois par l'administration de L-DOPA sur les 3 primates. A 9 mo PI, la TDM du mac8 est augmentée de 3,28 fois par la L-DOPA alors que pour les mac6 et mac7, les TDM sont augmentées en moyenne de $2,13 \pm 0,63$ fois OFF TMP et de $2,19 \pm 0,91$ ON TMP (TMP administré 60 minutes avant le challenge L-DOPA). Aucun effet adverse n'a été observés durant ces challenges L-DOPA. Après injection des mélanges de vecteurs viraux, que ceux-ci incluent la construction constitutive ou la régulable, l'administration de L-DOPA induit moins d'effet de récupération sur l'activité locomotrice des primates que celui observé au stade MPTP.

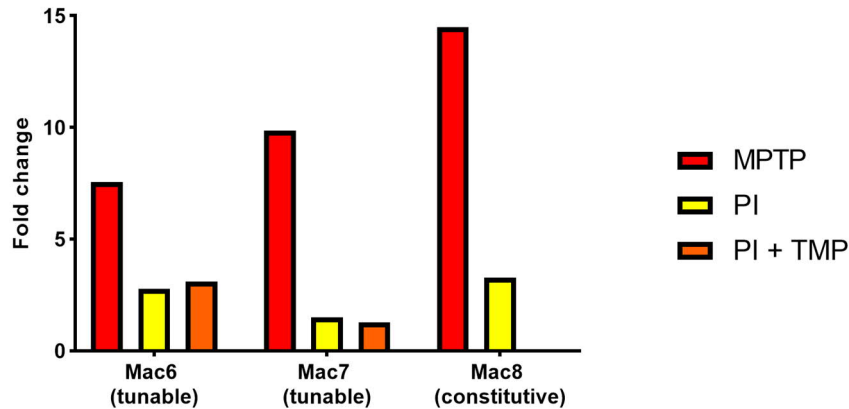


Figure 45 : Analyse de la réponse à la L-DOPA (administration orale de 30mg/kg de L-DOPA) durant des vidéos de six heures suite à l'intoxication au MPTP et à l'injection des vecteurs viraux. Quantification des changements dans les TDMs via Ethovision au stade stablement parkinsonien (MPTP) et après l'injection des vecteurs viraux sous traitement au TMP (PI + TMP = administration orale de 20mg/kg de TMP) ou non (PI). Les données sont exprimées relatives aux TDMs sans administration de L-DOPA pour chaque temps.

9.2. Comportement cognitif

Lors du test de discrimination visuelle, on peut observer (**Figure 46 A**) qu'après injection des vecteurs viraux les primates ont tendance à faire plus de réponses « succès » ($92,5 \pm 2,5\%$ pour les deux macaques avec thérapie régulable et $92,5\%$ pour le macaque avec thérapie constitutive vs $76,25 \pm 11,88\%$ pour les trois macaques au stade MPTP), moins d'erreurs ($7,5 \pm 2,5\%$ pour les deux macaques avec thérapie régulable et $7,5\%$ pour le macaque avec thérapie constitutive vs $22,08 \pm 12,17\%$ pour les trois macaques au stade MPTP) et moins de réponses « non touché » (aucun pour les trois macaques avec thérapie vs $1,67 \pm 1,1\%$ pour les trois macaques au stade MPTP) qu'au stade MPTP. Le léger déficit observé au stade MPTP est donc corrigé par les deux types de thérapie génique. Quant au temps de réaction, il semble être légèrement amélioré pour les primates injectés avec la thérapie régulable mais pas pour le primate injecté avec la thérapie constitutive (**Figure 46 B**).

Lors du test d'impulsivité, on a pu observer qu'après injection des vecteurs viraux les primates avec la thérapie régulable ont tendance à globalement faire plus de réponses « succès » ($91,25 \pm 4,38\%$ pour les deux macaques avec thérapie régulable et $72,5\%$ pour le macaque avec thérapie constitutive vs $47,71 \pm 23,08\%$ pour les trois macaques au stade MPTP), moins d'erreurs ($6,25 \pm 1,88\%$ vs $13,33 \pm 5,6\%$ pour les trois macaques au stade MPTP), à l'exception du primate constitutif qui fait plus d'erreurs ($26,25\%$) et moins de réponses « non touché » qu'au stade MPTP ($2,5 \pm 2,5\%$ pour les deux macaques avec thérapie régulable et $1,25\%$ pour le macaque avec thérapie constitutive vs $38,77 \pm 25,47\%$ pour les trois macaques au stade MPTP). Après thérapie génique les primates arrivent globalement à mieux respecter les délais et lâchent moins souvent le levier qu'au stade MPTP, ce qui suggère une diminution de leur impulsivité. Cependant, les résultats par délai montrent que la thérapie génique régulable semble avoir corrigé les déficits d'impulsivité des primates pour tous les délais alors que ce n'est pas le cas pour les délais les plus longs avec la thérapie constitutive (**Figure 46 C**). Quant au temps de réaction, il semble

être amélioré pour les primates injectés avec la thérapie régulable mais pas pour le primate injecté avec la thérapie constitutive (Figure 46 D).

Lors du test de motivation on a pu observer qu'après injection des vecteurs viraux les primates effectuent plus d'essais qu'au stade MPTP ($36,88 \pm 16,13$ pour les deux macaques avec thérapie régulable et $26,25$ pour le macaque avec thérapie constitutive vs $11,25 \pm 2$ pour les trois macaques au stade MPTP) même s'ils ne sont pas revenus à leur performances baseline (Figure 46 E). Ceci suggère un fort impact des thérapies géniques sur le comportement moteur et la motivation. Quant au temps de réaction, il semble être largement amélioré pour tous les primates, comparé aux réponses observées au stade MPTP (Figure 46 F).

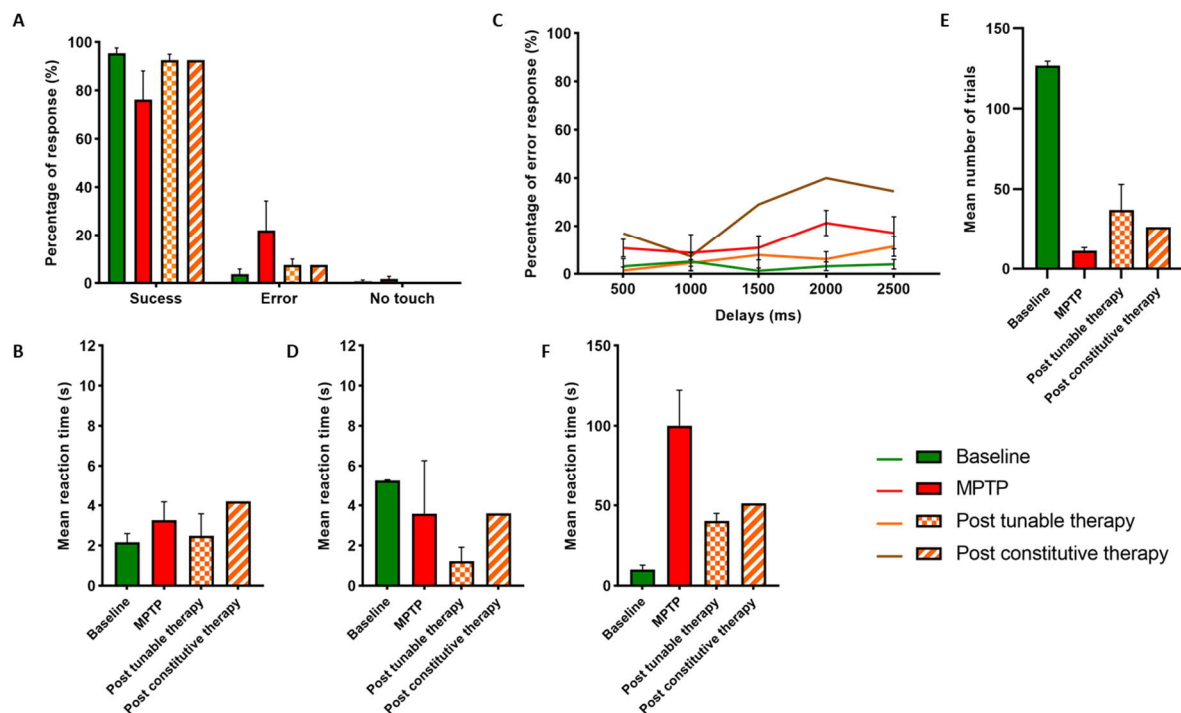


Figure 46 : Analyse du comportement cognitif sur les quatre dernières sessions des animaux au stade stablement parkinsonien et suite à l'injection des vecteurs viraux.

A) Moyenne des pourcentages de réussite, erreur et non touché au test de discrimination visuelle. **B)** Moyenne des temps de réaction du test de discrimination visuelle. **C)** Moyenne des pourcentages d'erreur selon les délais du test d'impulsivité. **D)** Moyenne des temps de réaction au test d'impulsivité. **E)** Moyenne du nombre d'essais effectués du test de motivation. **F)** Moyenne des temps de réaction du test de motivation. Les valeurs sont représentées comme moyenne \pm SEM.

Lors du test de gambling, dans la condition classique PGT (image à faible variabilité mais dont le gain moyen est supérieur - LVHP vs image à forte variabilité mais dont le gain moyen est inférieur - HVLP) les primates ont tendance à choisir l'image LVHP plus souvent après thérapie génique, comparé au stade MPTP ($83,75 \pm 6,25\%$ pour les deux macaques avec thérapie régulable et 75% pour le macaque avec thérapie constitutive vs $66,25 \pm 3,13\%$ pour les deux macaques au stade MPTP) ou MPTP + L-DOPA (Figure 47 A). Quant au temps de réaction, il semble être amélioré pour les primates injectés avec la thérapie régulable (Figure 47 D).

Pour la condition EPGT (image à faible variabilité et dont le gain moyen est équivalent - LVEP vs image à forte variabilité et dont le gain moyen est équivalent - HVEP) les primates ont tendance à choisir

l'image HVEP plus souvent après thérapie génique qu'au stade MPTP ($65,63 \pm 23,13\%$ pour les deux macaques avec thérapie régulable et $66,25\%$ pour le macaque avec thérapie constitutive vs $57,81 \pm 6,56\%$ pour les deux macaques au stade MPTP) ou MPTP + L-DOPA (**Figure 47 B**). Quant au temps de réaction, il semble être amélioré pour les primates injectés avec la thérapie régulable (**Figure 47 D**).

Pour la condition RPGT (image à faible variabilité et dont le gain moyen est inférieur – LVLP vs image à forte variabilité dont le gain moyen est supérieur – HVHP) les primates ont tendance à choisir l'image HVHP plus souvent après thérapie génique qu'au stade MPTP ($81,88 \pm 13,13\%$ pour les deux macaques avec thérapie régulable et $73,75\%$ pour le macaque avec thérapie constitutive vs $77,5 \pm 6,88\%$ pour les deux macaques au stade MPTP) ou MPTP + L-DOPA (**Figure 47 C**). Quant au temps de réaction, il semble être amélioré pour les primates injectés avec la thérapie régulable (**Figure 47 D**).

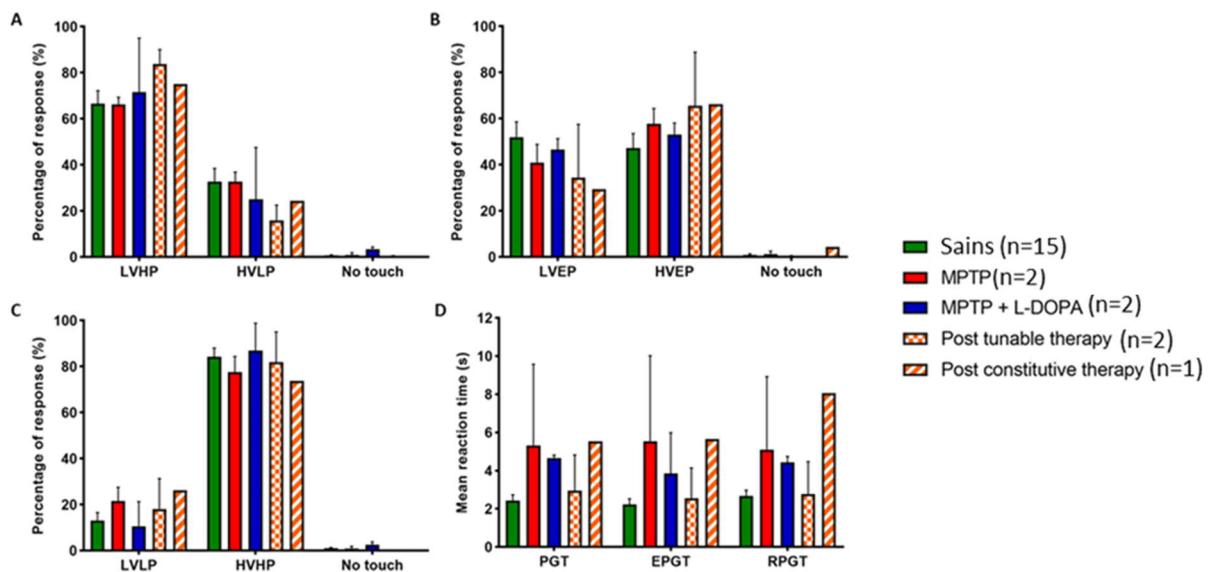


Figure 47 : Analyse des réponses au test de gambling sur les quatre dernières sessions des animaux au stade stablement parkinsonien et suite l'injection des vecteurs viraux.

A) Moyenne des pourcentages de choix de la condition PGT. LVHP = Low Variability High Payoff et HVLP = High variability Low Payoff **B)** Moyenne des pourcentages de choix de la condition EPGT. LVEP = Low variability Equivalent Payoff et HVEP = High variability Equivalent Payoff **C)** Moyenne des pourcentages de choix de la condition RPGT. LVLP = Low Variability Low Payoff et HVHP = High Variability High Payoff **D)** Moyenne des temps de réaction pour toutes les conditions. Les valeurs sont représentées comme moyenne \pm SEM.

Pour rappel, les tests de mémoire et de mémoire spatiale ont été réalisés uniquement à baseline et après injection des vecteurs viraux. Lors du test de mémoire on peut observer qu'après injection des vecteurs viraux les primates ont tendance à faire moins de réponses « succès » ($58,33 \pm 11,67\%$ pour les deux macaques avec thérapie régulable et $65,83\%$ pour le macaque avec thérapie constitutive vs $89,17 \pm 0,96\%$ pour les trois macaques au stade baseline), et plus d'erreurs ($41,67 \pm 11,67\%$ pour les deux macaques avec thérapie régulable et $34,17\%$ pour le macaque avec thérapie constitutive vs $10 \pm 0,48\%$ pour les trois macaques au stade baseline) qu'au stade baseline (**Figure 48 A**). Quant au temps de réaction, il semble être identique pour les primates injectés avec la thérapie régulable mais augmenté pour le primate injecté avec la thérapie constitutive (**Figure 48 B**).

Seul un des deux primates injectés avec la thérapie régulable a pu effectuer le test de mémoire spatiale au stade post-injection et sa performance semble identique à celles des trois primates à baseline (**Figure 48 C**). En revanche le primate injecté avec la thérapie constitutive semble effectuer moins de réponse « succès » (41,88% vs 88,54 ± 0,61%), plus d'erreurs (52,5% vs 10,42 ± 0,39%) et plus de réponses « non touché » (5,63% vs 1,04 ± 0,63%) que les singes à baseline. Quant au temps de réaction, il semble être augmenté pour les deux primates après injection des vecteurs viraux (**Figure 48 D**).

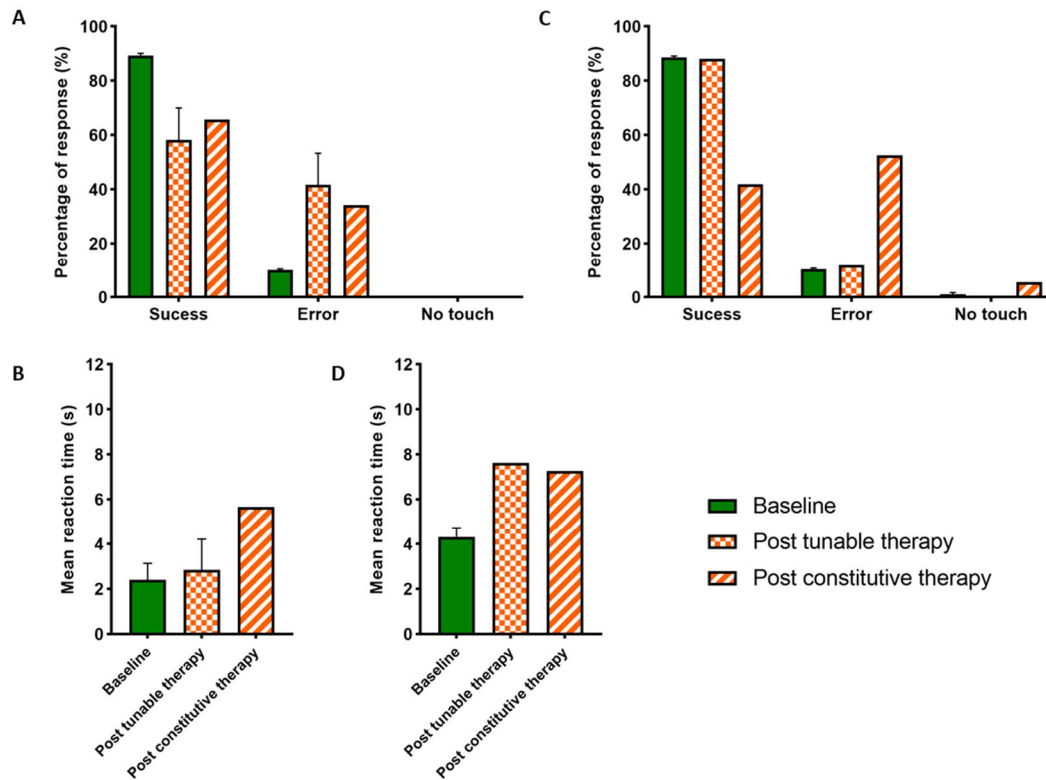


Figure 48 : Analyse du comportement cognitif sur les quatre dernières sessions des animaux suite à l'injection des vecteurs viraux.

A) Moyenne des pourcentages de réussite, erreur et non touché du test de mémoire à long terme. **B)** Moyenne des temps de réaction du test de mémoire à long terme. **C)** Moyenne des pourcentages de réussite, erreur et non touché du test de mémoire spatiale. **D)** Moyenne des temps de réaction du test de mémoire spatiale. Les valeurs sont représentées comme moyenne ± SEM.

9.3. Suivi de la température

Nous avons utilisé la température corporelle comme indice indirect de l'activité des animaux et leur patron de sommeil dans le but d'étudier les effets de l'injection des vecteurs viraux sur le cycle circadien. Nous avons compilé sur 24h toutes les données de température des trois singes au stade MPTP stable et après thérapie génique pour voir leur profil de température durant la journée. On peut observer que les profils de température des singes au stade MPTP et au stade post-injection durant la journée sont très différents (**Figure 49 A** et **Figure 49 C**). Pour les singes MPTP, la température est globalement assez stable avec peu de variations durant la journée. En revanche, en post-injection la température augmente progressivement avant que la lumière de l'animalerie ne s'allume et diminue progressivement après leur nourrissage jusqu'à l'extinction des lumières, ce qui est très similaire aux singes sains comme évoqué

dans la partie I. Le cycle journalier activité/repos est plus marqué pour les animaux après thérapie génique. Cela est confirmé par l'analyse de l'amplitude de variation de la température dans la journée (**Figure 49 B et Figure 49 D**). Les singes au stade MPTP montrent une amplitude de variation bien inférieure à celle observée au stade post-injection ($0,97 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$ vs $1,14 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$). Cette augmentation d'amplitude est due au fait que les animaux après thérapie génique semblent avoir récupéré un cycle d'activité/repos normal avec beaucoup moins de périodes de sommeil diurnes et de périodes de réveil nocturne. La température moyenne des primates post-injection est légèrement inférieure à celle au stade MPTP ($36,17 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ vs $36,26 \pm 0,49^{\circ}\text{C}$).

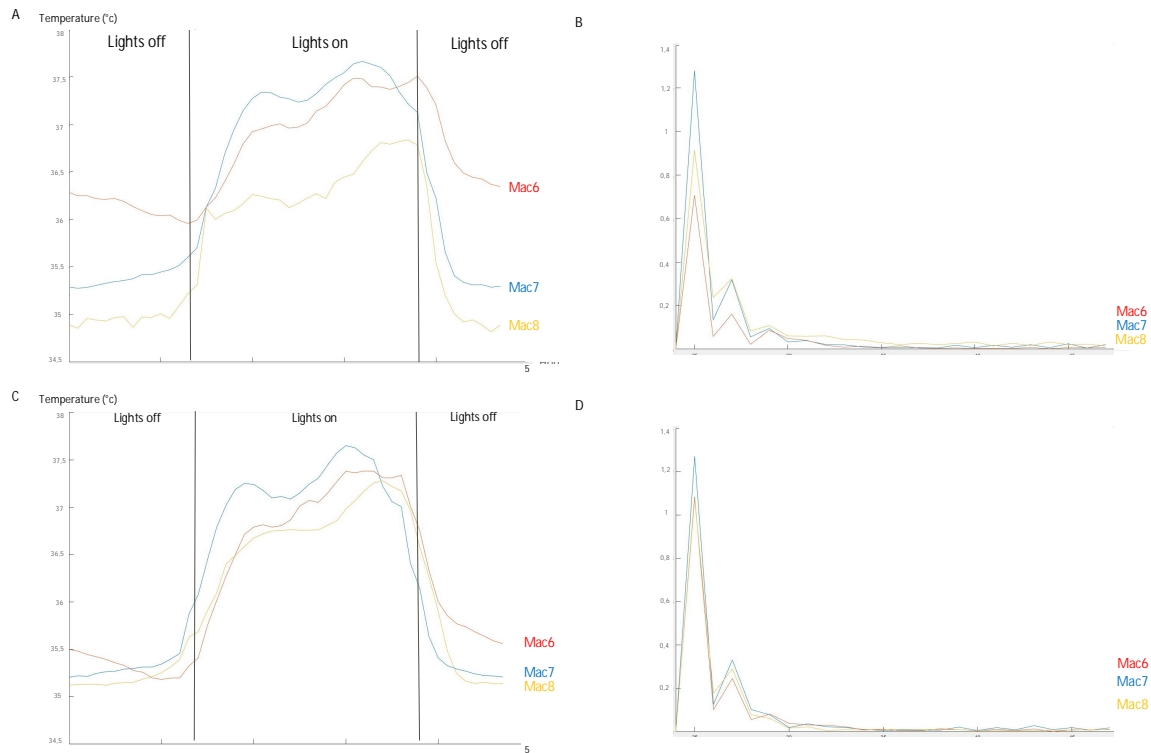


Figure 49 : Analyse du cycle activité/repos via la température corporelle des animaux suite à l'injection des vecteurs viraux.

A) Profil de température sur 24h au stade MPTP. **B)** Fréquence des amplitudes de variation de la température au stade MPTP. **C)** Profil de température sur 24h au stade post-injection. **D)** Fréquence des amplitudes de variation de la température au stade post-injection.

10. Discussion

Le protocole expérimental et les différents groupes de traitement mis en œuvre dans cette étude avait comme objectifs de :

- 1) Prouver que le système régulable DD-CH1 est fonctionnel et permet de moduler l'expression du transgène CH1 *in vivo* chez le primate via l'administration orale de l'antibiotique TMP.
- 2) Évaluer la sûreté et l'efficacité thérapeutique sur les symptômes moteurs de la co-injection locale d'un AAV-CH1 (régulable) et d'un AAV-TH (constitutif) dans le striatum d'un primate MPTP parkinsonien.
- 3) Évaluer la sûreté et l'efficacité thérapeutique de cette approche de thérapie génique sur les symptômes moteurs et non-moteurs lorsqu'un AAV-AADC (constitutif) est ajouté aux autres vecteurs viraux.
- 4) Valider l'utilisation des outils développés dans la première partie de ma thèse pour évaluer l'efficacité de nouvelles thérapies sur les NMS chez le primate MPTP sévèrement symptomatique.

Les résultats des évaluations motrices des différents groupes de la première partie de l'étude pilote ont prouvé que l'expression striatale des transgènes TH et CH1 ne suffit pas à apporter une amélioration des symptômes moteurs chez les singes MPTP sévèrement symptomatiques. Ceci est probablement dû à la sévérité du modèle et au degré de déplétion trop important des niveaux endogènes d'AADC induit par le protocole aigu d'intoxication au MPTP. En effet, les résultats du comportement moteur de la deuxième partie de l'étude pilote prouvent qu'une amélioration motrice marquée et progressive est observée lorsque les enzymes AADC, TH et CH1 sont co-exprimées dans le striatum que ce soit de façon constitutive ou régulable. Plus précisément, le primate injecté avec les trois enzymes exprimées constitutivement montre une amélioration des scores cliniques au cours du temps qui n'est pas retrouvée lors de l'évaluation de l'activité locomotrice spontanée (TDM). Ceci était attendu puisque cet individu a montré une récupération spontanée de son activité motrice au stade MPTP avant la chirurgie, ce qui rend impossible d'interpréter correctement les résultats post-injection. Cependant, l'effet thérapeutique a été confirmé par le challenge L-DOPA effectué après chirurgie qui montre que l'administration de L-DOPA a moins d'effets sur l'activité locomotrice après injection des vecteurs viraux qu'au stade MPTP. On peut en déduire qu'après transfert de gènes, il y a une meilleure occupation des récepteurs dopaminergiques par la dopamine néo-synthétisée résultant de la transfection des neurones striataux. Une amélioration des fonctions locomotrices a été également observée chez les deux primates traités par la thérapie régulable que ce soit au niveau des scores cliniques, de la locomotion spontanée ou des challenges L-DOPA. De plus, nous avons observé que pour les scores cliniques et la locomotion spontanée, les effets majeurs de la thérapie sont apparus sous traitement TMP, soit lorsque l'enzyme CH1 est exprimée, ce qui démontre la fonctionnalité du système de régulation. Pourtant ce n'est pas ce qui a été observé lors des challenges L-DOPA où l'administration de TMP avant le test n'a pas eu d'incidence. Pour rappel, lors du challenge L-DOPA OFF TMP les animaux sont sous traitement chronique au TMP mais l'administration de l'antibiotique est faite après le challenge. Il est peut-être possible qu'il y ait une activité résiduelle du TMP dû à l'administration de la veille (demi vie= 12h) ou que le switch OFF ne se fasse pas aussi rapidement. Dans l'ensemble, ces résultats montrent le caractère complémentaire des trois types d'évaluations du comportement moteur, à savoir, les scores cliniques,

l'activité locomotrice spontanée et l'activité locomotrice induite, qui décrivent de façon qualitative et quantitative les mouvements de l'animal.

Lorsque l'on compare les effets des deux types de thérapies sur les symptômes moteurs à 9 mo PI on s'aperçoit que l'amélioration des scores cliniques des animaux injectés avec la thérapie régulable est moindre que celle du primate injecté avec la thérapie constitutive. Cela pourrait dû au fait que ces animaux n'ont eu que quatre mois de traitement TMP et donc de thérapie « active » comparé aux neufs mois de thérapie active pour le troisième primate (thérapie constitutive). D'ailleurs ce dernier primate avait un score clinique semblable aux deux autres à quatre mois post-injection. Comme déjà évoqué, nous ne pouvons pas comparer l'amélioration des activités motrices spontanées des deux groupes en termes de TDM. En revanche, la récupération motrice des deux animaux injectés avec la thérapie régulable semble être plus élevée que celle observée au laboratoire suite à l'injection du vecteur viral AXO-LENTI-PD dans le putamen, qui est un lentivirus exprimant constitutivement l'AADC, la TH et le CH1 (Badin et al., 2019).

Lors de cette étude nous avons également évalué l'effet thérapeutique de ces approches sur les symptômes non-moteurs des primates parkinsoniens. En effet, les animaux ont été injectés à la fois dans le putamen sensorimoteur et dans le noyau caudé, une stratégie susceptible d'avoir un effet sur les NMS. C'est la première fois à notre connaissance que les symptômes non-moteurs sont pris en compte dans l'évaluation thérapeutique d'une thérapie génique chez le primate MPTP.

Les résultats des tests cognitifs prouvent qu'il existe une amélioration cognitive avec les deux types de thérapies. Cela se voit notamment au test de discrimination visuelle où après thérapie les performances semblent se normaliser au même niveau qu'à baseline pour les trois animaux. L'amélioration des performances de ce test en post-injection est certainement dû en grande partie à l'amélioration motrice mais peut être également à une régulation des déficits attentionnels et de la mémoire de travail. Une amélioration des performances au test de motivation a également été observée pour les trois animaux, par comparaison au stade MPTP stable. Néanmoins, contrairement au test de discrimination visuelle cette récupération reste partielle, les performances après traitement ne revenant pas aux niveaux baseline. Ayant observé une amélioration de la locomotion après thérapie (au moins chez les deux singes injectés avec la thérapie régulable), la différence des performances post-injection comparées à baseline ne peut pas s'expliquer par une simple différence d'efficacité sur les déficits moteurs. Il est également possible que l'aire de distribution du vecteur thérapeutique n'ait pas été suffisante pour atteindre la partie limbique du striatum (aucune injection n'ayant été planifiée dans le noyau accumbens) et donc pour être en capacité d'agir sur les processus motivationnels.

Contrairement aux tests de discrimination visuelle et de motivation, des différences ont été observées après thérapie dans le cas du test de l'impulsivité. Les primates injectés avec la thérapie régulable semblent montrer une normalisation des performances après traitement, présentant des résultats très proches de ceux observés à baseline. En revanche, le singe injecté avec la thérapie constitutive fait plus d'erreurs après traitement qu'au stade MPTP, plus particulièrement pour les délais les plus longs, ce qui suggérerait une aggravation de l'impulsivité potentiellement en lien avec une hyperdopaminergie.

Enfin, avec le test de gambling nous avons observé que les performances des primates après intoxication au MPTP étaient très similaires à celles de singes sains, ceci étant attendu puisque aucun déficit n'est observé chez les patients parkinsoniens naïfs et puisque les comportements de gambling résultent que

des traitements pharmacologiques (notamment les agonistes dopaminergiques) (Djamshidian, Cardoso, Grosset, Bowden-Jones, & Lees, 2011). A la suite des deux types de thérapie, et comme ça avait été observé sous traitement L-DOPA, les animaux semblent préférer les images associées avec le gain moyen le plus élevé (en condition PGT et RPGT), comparé à la fois à leurs performances au stade MPTP et à celles de primates sains. Après thérapie, les primates semblent donc développer une stratégie de gain global plus marquée mais sans forcément une prise de risque associé. Lorsque cette stratégie du gain global ne s'applique pas (en condition EPGT où les deux images présentées ont un gain global équivalent), les animaux traités par les deux types de thérapie semblent choisir davantage l'image avec le gain le plus variable par comparaison avec leurs performances au stade MPTP et celles de primates sains. Ceci pourrait possiblement être dû à une hyperdopaminergie. Cependant, le faible nombre d'individus ayant réalisé ce test et les importantes différences entre les deux singes injectés avec la thérapie régulable nous empêchent d'émettre de conclusion à ce stade et d'autres animaux sont nécessaires pour confirmer les tendances observées lors de cette étude.

Les animaux traités par thérapie génique (constitutive ou régulable), en plus d'avoir montré une amélioration de leurs déficits cognitifs, montrent également une certaine normalisation de leur cycle activité/repos. En effet, après intoxication au MPTP, les animaux présentaient un cycle journalier d'activité (visualisé indirectement par la température corporelle) fracturé avec une faible amplitude de variation, alors qu'après thérapie les patrons de fréquence et variation de la température sur 24 heures sont très similaires à ceux des singes sains.

Avec seulement $n=2$ et $n=1$ par groupe il est évidemment impossible d'émettre de conclusion ferme sur ces résultats préliminaires et il sera nécessaire de tester un plus grand nombre de primates pour confirmer ou infirmer ces premiers résultats. Cependant, nous avons pu montrer que les tests cognitifs sur écran tactile et le suivi de la température sont assez sensibles pour mettre en avant non seulement des déficits au stade MPTP mais aussi de potentielles améliorations après injection d'une thérapie génique. Ces biomarqueurs peuvent donc se révéler très utiles pour mesurer l'effet potentiel de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Il aurait été intéressant de voir si les effets comportementaux observés après thérapie étaient associés à une augmentation de l'activité du système dopaminergique dans les deux régions injectées, le putamen et le noyau caudé. Comme déjà évoqué nous avons prévu de réaliser des images TEP 18F-FMT afin d'évaluer la restauration de l'activité de l'enzyme AADC *in vivo* mais cela n'a pas pu être possible à cause du confinement et de la crise sanitaire du COVID19, la mise en œuvre de telles expériences d'imagerie nécessitant un personnel nombreux et la mise en œuvre de nombreuses compétences impossibles à réunir pendant cette période. Le radioligand 18F-FMT avait par ailleurs été spécifiquement choisi en raison de sa liaison spécifique avec l'AADC. Ce radioligand a déjà été utilisé pour évaluer la conversion de la L-DOPA en dopamine chez des patients atteints de la MP ayant reçu un vecteur AAV-AADC (Christine et al., 2019; Christine et al., 2009; Eberling et al., 2008; Mittermeyer et al., 2012; Muramatsu et al., 2002) et chez des primates MPTP ayant reçu le vecteur viral AXO-LENTI-PD au laboratoire (Badin et al., 2019). Une autre solution pour étudier l'état du système dopaminergique aurait été de faire de la microdialyse pour mesurer le taux de dopamine produite localement, comme ça a été le cas dans l'étude chez le rat (Cederfjall et al., 2015) et chez le primate injecté avec le lentivirus Prosavin® (Jarraya et al., 2009). En revanche, cela aurait limité les analyses immunohistochimiques car la microdialyse engendre de la perte cellulaire autour des canules et de l'inflammation à proximité du puit de descente de la canule (Boulet et al., 2008). Nous avons donc décidé de privilégier les analyses post-mortem histologiques et

biochimiques au détriment de la microdialyse. Ces analyses sont toujours en cours actuellement chez notre collaborateur.

Dans l'optique de confirmer et de mieux publier ces résultats, nous avons fait une demande de financement pour poursuivre cette étude avec plus d'individus. La suite porterait sur 16 macaques qui seraient distribués en 4 groupes de traitement :

- 4 macaques MPTP injectés avec un AAV-AADC, un AAV-TH et un AAV-DDCH1 (thérapie régulable) afin de compléter notre groupe et confirmer ce qu'on a observé chez les deux singes.
- 4 macaques MPTP injectés avec un AAV-AADC, un AAV-TH et un AAV-CH1 (thérapie constitutive) afin de compléter notre groupe et confirmer ce qu'on a observé chez le premier singe et pouvoir mieux comparer les deux stratégies.
- 4 macaques MPTP injectés avec un vecteur null afin d'avoir des contrôles négatifs.
- 4 macaques MPTP injectés avec un AAV-CH1 (constitutif) dans le putamen et un AAV-DDCH1 (régulable) dans le caudé afin d'observer les effets de la modulation sur les déficits cognitifs uniquement.

Il est important de noter que ni l'administration des vecteurs viraux ni l'administration quotidienne de TMP n'ont engendré de la toxicité ou d'effets secondaires lors de cette étude. Des données dans la littérature montrent que la prise quotidienne d'antibiotique peut engendrer des problèmes gastro-intestinaux et le développement d'une résistance aux antibiotiques chez l'homme (K. Gupta, 2002). Des essais dans la rétine de souris ont été faits avec une molécule mimant le TMP, qui ont prouvé qu'elle pouvait stabiliser le DD (H. Peng et al., 2019) sans développement d'effet secondaire. Ce type de molécule pourrait être privilégiée dans le futur pour assurer le caractère translationnel de notre approche.

Cette étude est la première à démontrer la sécurité et l'efficacité préclinique d'une thérapie génique régulable chez le primate non-humain. Les thérapies géniques actuellement en essai clinique dans le cadre de la MP sont toutes constitutives. Vu leur caractère irréversible, le développement de thérapies régulières se présente donc comme une alternative intéressante permettant d'accroître leur sûreté et de pouvoir adapter le traitement aux besoins de chaque patient. Une telle approche permettrait de reproduire un tonus dopaminergique modulé de façon plus physiologique et adapté à chaque patient, tout autorisant un dosage de la quantité de dopamine produite in situ en fonction de chaque sujet, selon la sévérité et le stade d'évolution de sa pathologie.

**PARTIE III : CARACTERISATION D'UN
MODELE ALPHA-SYNUCLEINE CHEZ LE
PRIMATE NON-HUMAIN**

11. Contexte

Au vu du rôle majeur de la protéine alpha-synucléine dans la pathologie de la maladie de Parkinson, le développement de modèles animaux présentant à la fois une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN et une pathologie liée à l' α -syn robuste est plus que nécessaire. Ces dernières années, un grand nombre de modèles animaux basés sur la surexpression de cette protéine ont été développés. Trois principales stratégies ont été utilisées jusqu'à présent :

- Générer des modèles transgéniques de surexpression de l' α -syn
- Générer des modèles de surexpression de l' α -syn en utilisant des vecteurs viraux
- Générer des modèles de propagation de l' α -syn en inoculant directement la protéine

11.1. Les modèles transgéniques

Les modèles de primates transgéniques qui surexpriment l'alpha-synucléine WT ou mutée ont déjà été abordés en introduction 5.2.

Globalement, ces modèles induisent une pathologie liée à l'alpha-synucléine qui génère une modeste altération de la voie dopaminergique nigrostriée, qui n'est pas suffisante pour engendrer le phénotype caractéristique de la MP. Dans la maladie de Parkinson idiopathique le niveau basal d'alpha-synucléine n'est pas forcément augmenté, mais il a été observé que sa forme pathologique l'est. Ces modèles transgéniques de surexpression constitutive de la protéine miment donc plutôt une MP dont l'origine serait génétique avec une duplication ou une triplification du gène SNCA (Gómez-Benito et al., 2020). De plus, du fait de l'expression précoce de la protéine dans ces modèles, des phénomènes de compensation peuvent également se mettre en place.

11.2. Les modèles par surexpression virale

L'utilisation de vecteurs viraux pour surexprimer l'alpha-synucléine a commencé dans les années 2000. Cela permet, contrairement aux modèles génétiques, de cibler la surexpression de la protéine dans une région précise. De nombreuses équipes ont ainsi injecté des LV ou des AAV (Lo Bianco, Ridet, Schneider, Deglon, & Aebischer, 2002) exprimant l' α -syn sous sa forme WT ou mutée (A53T ou A30P) dans la SN de rongeurs. Les effets de ces injections sont assez variables d'une étude à l'autre et dépendent de plusieurs paramètres : le vecteur viral utilisé, le promoteur utilisé, le type d' α -syn utilisé, la dose utilisée et le temps d'attente après injection. Globalement, ils ont observé une perte de neurones dopaminergiques de la SN (entre 30 et 80% selon les études), une dénervation dopaminergique au niveau du striatum (entre 25 et 90% selon les études), la présence d'inclusions d'alpha-synucléine près du site d'injection et quelques déficits moteurs légers.

Au vu de ces résultats prometteurs chez le rongeur, des essais ont ensuite été réalisés chez le marmoset avec notamment l'injection d'un AAV exprimant l' α -syn WT ou A53T dans la SN (Kirik et al., 2003). Comme chez le rat, ils ont observé 30 à 60% de perte de neurones dopaminergiques de la SN, 40

à 60% de perte de fibres dopaminergiques dans le striatum, des inclusions d' α -syn et des neurites dystrophiques près du site d'injection et quelques déficits moteurs légers (biais de la tête) après 4 mois. Dans une étude suivante, ils ont cette fois-ci attendu 1 an avant de sacrifier les animaux afin d'explorer les effets à plus long terme et ils ont observé des effets plus marqués, surtout avec la forme mutée A53T (Eslamboli et al., 2007). Cette stratégie a aussi été testée chez des primates plus âgés pour voir si l'âge augmente la susceptibilité à la toxicité de l'alpha-synucléine A53T surexprimée dans la SN. Selon les études l'âge semble jouer un rôle (Yang et al., 2015) ou non (Bourdenx et al., 2015). Par ailleurs, plusieurs titres viraux et volumes ont été évalués chez le macaque afin d'optimiser la stratégie (Koprach, Johnston, Reyes, Omana, & Brotchie, 2016) et ils ont obtenu les meilleurs résultats (50% de perte neuronale dans la SN et 70% de perte de fibres dans le striatum) avec le titre viral le plus élevé à 4 mois post injection.

Afin d'optimiser la pathologie liée à l' α -syn ces vecteurs viraux ont également été injectés dans la SN de souris transgéniques où l'alpha-synucléine est déjà surexprimée (Ikeda et al., 2009; Ip et al., 2017; Lauwers et al., 2003; Oliveras-Salva et al., 2013).

Globalement ces modèles induisent une dégénérescence dopaminergique plus robuste que les modèles transgéniques et des déficits moteurs légers. Ils induisent également une pathologie liée à l'alpha-synucléine avec notamment des inclusions contenant de l' α -syn phosphorylée mais celle-ci n'ont pas toutes les caractéristiques des LB (inclusions nucléaires plutôt qu'intra-cytoplasmiques) et restent globalement proches du site d'injection, au niveau des neurones transduits. De plus, la progression de la pathologie est beaucoup plus rapide que chez le patient (Decressac, Mattsson, Lundblad, Weikop, & Bjorklund, 2012).

11.3. Les modèles par inoculation

Depuis l'observation d'inclusions d'alpha-synucléine dans les neurones fœtaux transplantés dans le cadre d'une thérapie cellulaire chez des patients parkinsoniens (Kordower et al., 2008; J. Y. Li et al., 2008), on a découvert que l' α -syn pathologique endogène est capable de se propager d'une cellule à une autre localement et d'induire de la pathologie dans des cellules transplantées. Cela a été validé par des études *in vitro* où il a été observé que l'ajout de fibres pathologiques d'alpha-synucléine humaines dans des cultures de neurones de rongeur transgénique déclenche un phénomène d'amplification qui induit l'agrégation de l' α -syn endogène et la formation d'inclusions d' α -syn dans ces cellules (Luk et al., 2009; Volpicelli-Daley et al., 2011).

Cette capacité de l' α -syn pathologique « d'infecter » des cellules et de se comporter comme amorce pour l'agrégation de la protéine, dans un processus similaire aux prions, a été repris pour développer des modèles de propagation *in vivo* par inoculation directe de la protéine. Plusieurs « types » d' α -syn pathologique ont été inoculés jusqu'à présent : des homogénats de cerveaux de souris transgéniques, des extraits de LB de cerveaux de patients ou des fibres d'alpha-synucléine synthétisées *in vitro*.

Les premières inoculations chez l'animal ont été faites avec des homogénats de cerveaux de souris transgéniques A53T âgées dans le striatum dorsal de souris A53T jeunes asymptomatiques. Le but était d'évaluer si cela pouvait accélérer le processus pathologique dans ce modèle (Luk, Kehm, Zhang, et al.,

2012; Mougenot et al., 2012). Ils ont en effet observé l'accélération de la pathologie avec la formation d'inclusions d'alpha-synucléine dans des régions distantes du site d'injection.

Par la suite l'inoculation d'extraits de LB de patients parkinsoniens a été évalué chez le rongeur (Bourdenx et al., 2015; Recasens et al., 2014) et chez le primate (Arotcarena et al., 2020; Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014). Dans la première étude chez le macaque (Recasens et al., 2014), l'injection d'extraits de LB provenant de trois patients parkinsoniens dans le striatum moteur ou dans la SN ont été comparées. Ils ont observé à 14 mois post-injection une perte de neurones dopaminergiques de 40% pour les animaux injectés dans le striatum, plus marquée par rapport à ceux injectés dans la SN (15%). La propagation de la pathologie liée à l' α -syn était large (putamen, SN, GP, gyrus précentral, gyrus frontal supérieur, cortex entorhinale) pour les animaux injectés dans le striatum et globalement restreinte à la SN pour les animaux injectés dans la SN. Ces expériences suggèrent que l'injection de LB dans le striatum de primate permet donc une bonne propagation de la pathologie avec une atteinte de la SN modérée. La même équipe a ensuite comparé l'effet de l'injection d'extraits de LB de patients dans le striatum moteur ou dans le système entérique chez le babouin jeune adulte ou âgé (Arotcarena et al., 2020). Ils ont observé que les deux sites d'injection aboutissent à des lésions nigrostriatales et entériques. Ce résultat suggère que la progression de la pathologie alpha-synucléine pourrait être soit caudo-rostrale soit rostro-caudale, variant selon les patients. De plus, ils n'ont pas observé de lésions pathologiques α -syn dans le nerf vague et suggèrent que la circulation agit comme une voie de transmission bidirectionnelle à longue distance de l' α -syn endogène entre les systèmes nerveux entérique et central plutôt que par le nerf vague et le noyau moteur dorsal du nerf vague. Dans une récente étude (Bourdenx et al., 2020), l'injection de LB dans le striatum de babouins a été comparée à l'injection d'alpha-synucléine soluble ou agrégée (non LB) provenant des mêmes patients. Ils ont observé à 24 mois post-injection que l' α -syn sous sa forme soluble ou agrégée est capable d'induire une propagation de la pathologie α -syn, une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN et de leurs afférentations striatales semblable à l'injection de LB. Ils ont observé chez ces animaux une diminution de la locomotion spontanée mais pas de phénotype robuste. Ces résultats suggèrent que les deux formes, soluble et agrégée (non LB) sont également capables d'induire une dégénérescence dopaminergique chez le primate non-humain alors que ce n'est pas le cas chez le rongeur (Recasens et al., 2014). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène : les neurones dopaminergiques des primates seraient plus susceptibles à la toxicité de l'alpha-synucléine ou bien la présence d'autres agents pathogènes dans les fractions de cerveaux utilisées pourraient faciliter ou aggraver la pathologie.

En parallèle, certaines études ont testé l'inoculation de fibres synthétisées in vitro en laboratoire chez le rongeur. Les injections ont eu lieu dans le striatum (Karampetsou et al., 2017; Luk, Kehm, Carroll, et al., 2012; Luk, Kehm, Zhang, et al., 2012; Milanese et al., 2018; Okuzumi et al., 2018; Patterson et al., 2019; Paumier et al., 2015; Thakur et al., 2017), dans la SN (Earls et al., 2019; Harms et al., 2017) ou en périphérie (Uemura et al., 2018) chez des souris WT, transgéniques A53T et KO α -syn. Malgré des différences dans les résultats de ces études (dues au site d'injection, à la dose de fibres injectée et au modèle utilisé) il en est ressorti que la protéine sous sa conformation de fibre suffit à initier la pathologie (formation d'inclusions de type LB et LN à distance du site d'injection) ainsi qu'une perte de neurones dopaminergiques dans la SN, une réduction du taux de dopamine striatale et quelques déficits moteurs. Il y a également eu des essais avec des fibres synthétiques modifiées comme des fibres phosphorylées au résidu S129 et dans ce cas la pathologie α -syn est plus prononcée au niveau de la SN (Karampetsou

et al., 2017). Chez le primate, seules deux études ont évalué l'injection de fibres synthétiques d'alpha-synucléine dans le striatum à notre connaissance. Dans une première étude des fibres synthétiques de souris ont été injectées unilatéralement dans le striatum (putamen uniquement ou bien dans le putamen et le noyau caudé) de marmousets (Shimozawa et al., 2017). A seulement trois mois post-injection ils ont observé une propagation de la pathologie alpha-synucléine avec notamment des inclusions de type LB dans les neurones endogènes dans des régions éloignées des sites d'injection (tels que la SN, l'amygdale, différents cortex, le thalamus, le GP ou encore l'hippocampe) et une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN modeste (20-40%). Ces altérations étaient plus marquées pour le primate injecté à la fois dans le putamen et dans le caudé. Dans la seconde étude (Chu et al., 2019), des macaques ont été inoculés unilatéralement dans le putamen avec des fibres synthétiques. Ils ont observé des inclusions d'alpha-synucléine phosphorylée (thioflavin S positives) dans la SN ipsilatérale et localement, proche du site d'injection ainsi qu'une réduction de 29% des neurones dopaminergiques de la SN à 15 mois post-injection.

Globalement toutes ces études ont prouvé que les fibres synthétiques d'alpha-synucléine inoculées dans le striatum peuvent se propager de cellule en cellule et atteindre des régions éloignées du site d'injection où elles génèrent de la pathologie (agrégation et phosphorylation). Le transport rétrograde de l'alpha-synucléine pathologique jusqu'à la SN induit une mort neuronale progressive modérée qui n'est pas suffisante pour engendrer un phénotype robuste. Ces modèles sont relativement plus progressifs que ceux par surexpression virale mais restent rapides par rapport à la maladie humaine.

Il y a quelques années, différentes souches de fibres d' α -syn ont été découvertes. Ces souches ont des conformations 3D différentes (Bousset et al., 2013; Guo et al., 2013; Malfertheiner, Stefanova, & Heras-Garvin, 2021; C. Peng, Gathagan, & Lee, 2018). Deux souches en particulier ont été étudiées par des membres de notre laboratoire, l'une ayant une forme qui rappelle un spaghetti, appelée fibrille (FIB) et l'autre ayant une forme plus plate qui rappelle une linguine, appelée ruban (RIB) (**Figure 50**) (Bousset et al., 2013; Guo et al., 2013). Ces différentes souches ont des caractéristiques biochimiques et fonctionnelles différentes, ce qui pourrait expliquer des différences de propagation (par interaction avec d'autres protéines) et in fine les différents phénotypes entre les synucleinopathies (Fenyi et al., 2021; Gracia, Camino, Volpicelli-Daley, & Cremades, 2020; Melki, 2015; Peelaerts, Bousset, Baekelandt, & Melki, 2018).

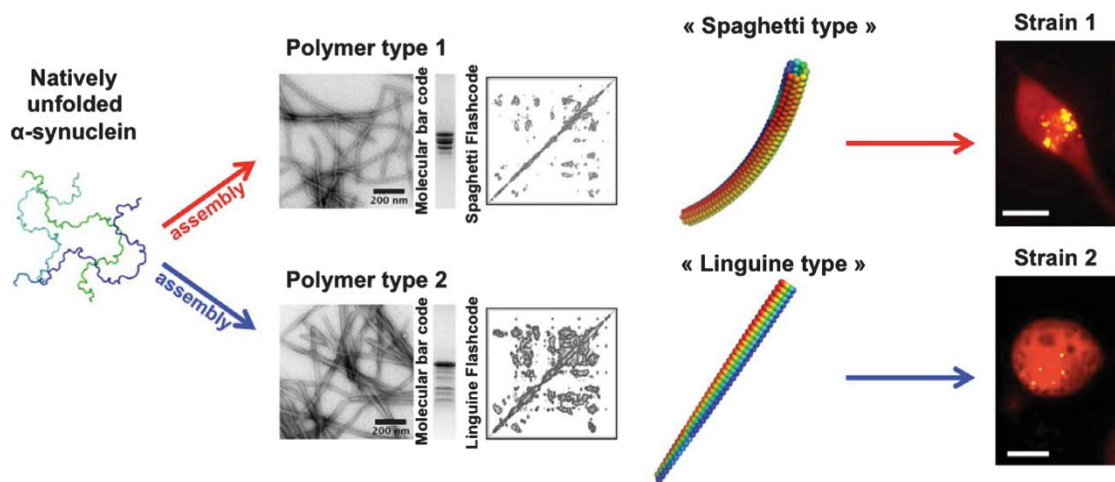


Figure 50 : Structures amyloïdes de deux souches d'alpha-synucléine. D'après (Melki 2015).

L'alpha-synucléine nativement dépliée peut s'assembler en polymères qui n'ont pas les mêmes conformations au microscope électronique. L'une d'elle à une forme de spaghetti (FIB, flèches rouges) alors que l'autre a une forme de linguine (RIB, flèches bleues).

Pour confirmer cette hypothèse *in vivo*, les souches fibrillaires FIB et RIB ont été inoculées dans la SN ou le striatum de rats WT (Peelaerts et al., 2015). Dans une 1^{ère} expérience, les différentes souches fibrillaires (FIB ou RIB) ainsi que des oligomères et des homogénats de cerveaux de souris transgéniques A30P ont été injectés dans la SN de rats. A quatre mois post-injection, ils ont observé la formation d'inclusions positives à l'alpha-synucléine phosphorylée de type LB et LN près du site d'injection pour les animaux injectés avec les souches fibrillaires uniquement (avec un plus grand nombre d'inclusions pour les RIB). En revanche l'injection de ces fibres n'a pas induit de perte cellulaire dopaminergique et seulement un léger déficit moteur. Dans une deuxième expérience, ils ont co-injecté les souches fibrillaires d'alpha-synucléine, oligomères et homogénats de cerveaux avec un AAV- α -syn ce qui a accentué la pathologie pour les animaux injectés avec les souches fibrillaires uniquement, cette fois-ci engendrant de la perte dopaminergique et des déficits moteurs aggravés. Ils ont observé que les RIB induisent plus d'inclusions d'alpha-synucléine mais que les FIB induisent plus de toxicité dopaminergique. Dans une troisième expérience, les fibres et les oligomères ont été injectés dans le striatum avec une co-injection ou non d'un AAV- α -syn afin d'étudier la propagation de la pathologie. Ils ont observé la présence d'inclusions d'alpha-synucléine le long du trajet nigro-striatal pour les animaux injectés avec les souches fibrillaires uniquement. En résumé, les inoculations de différentes souches fibrillaires ont abouti à une propagation de la pathologie α -syn spécifique à chaque souche amenant à un phénotype neurotoxique lui aussi spécifique à la souche. De plus, l'inoculation de fibres dans des conditions où l'alpha-synucléine est en surexpression exacerbe la neurodégénérescence et donc l'altération motrice de façon souche-dépendante.

12. Objectifs

Comme évoqué en introduction de ce manuscrit, de plus en plus d'études portent sur l'évaluation de thérapies et de biomarqueurs spécifiques de l'alpha-synucléine. Or, les modèles rongeurs disponibles, tout en permettant d'aborder des hypothèses dans un stade initial des recherches, ne permettent pas de se placer dans un contexte translationnel en termes de mise à l'échelle, étude de l'immunogénicité ou biodistribution et impact fonctionnel des traitements. Comme évoqué dans le chapitre précédent, les modèles primates de la MP les plus utilisés en préclinique actuellement sont ceux induits par des neurotoxines, et notamment le modèle MPTP, qui ne développent quasiment pas de pathologie α -syn et qui ne sont donc pas adaptés à ce type d'études. Ceci met en évidence le besoin de développer, caractériser et valider des modèles de synucléinopathie chez le primate. Les résultats prometteurs obtenus par des membres du laboratoire suite à l'inoculation de différentes souches fibrillaires d'alpha-synucléine chez le rat prouvent qu'il est possible d'induire une propagation, agrégation et phosphorylation robuste et surtout souche-dépendante (Peelaerts et al., 2015). On a donc étudié pour la première fois si la propagation souche-dépendante peut avoir lieu dans une espèce proche de l'Homme. Dans cette étude, nous avons inoculé ces mêmes souches fibrillaires d'alpha-synucléine dans le striatum de primates non-humains afin de mieux comprendre les mécanismes pathologiques induits par les différentes espèces fibrillaires et voir l'effet fonctionnel en termes d'altération dopaminergique et de phénotype. Nous avons décidé de comparer l'impact de l'inoculation de ces souches sur la pathologie alpha-synucléine, le système dopaminergique et le comportement moteur à l'inoculation d'extraits de LB de cerveaux de patients parkinsoniens qui ont déjà été injectés dans le striatum de PNH (Recasens et al., 2014). Dans un premier temps, une étude pilote sur un faible nombre de primates a été réalisée pour évaluer la faisabilité et la validité du protocole expérimental. Cette étude pilote est décrite en détail ci-dessous.

13. Protocole expérimental

Quatre macaques ont reçu une injection bilatérale dans le putamen sensorimoteur post-commissural de FIB (n=1), RIB (n=1) ou LB dérivés de patients (n=2). Le temps de survie des animaux post-inoculation était de 18 mois. L'impact de ces injections a été évalué par un suivi longitudinal *in vivo* par imagerie TEP (18F-FGD et 18F-FMT) et le suivi du comportement moteur à 6, 9, 12 et 18 mois post-injection (**Figure 34**). Une IRM anatomique a été réalisée avant la chirurgie pour déterminer précisément les coordonnées des sites d'injection. Des analyses post-mortem histologiques et biochimiques ont été réalisées pour évaluer l'altération de la voie nigrostriée et la pathologie alpha-synucléine.

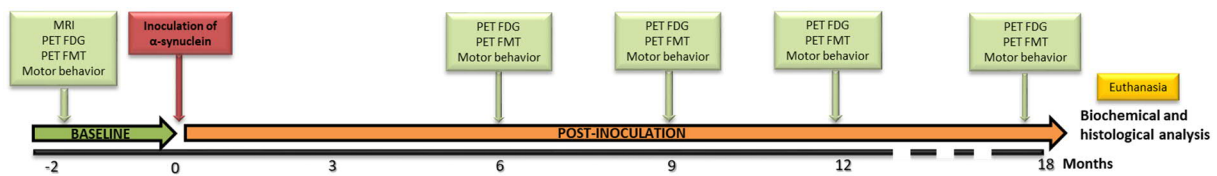


Figure 51 : Protocole expérimentale de l'étude pilote sur la caractérisation d'un modèle alpha-synucléine chez le primate non-humain

14. Matériel et Méthode

14.1. Sujets

Quatre macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) mâles adultes, provenant de l'île Maurice, d'âge moyen $4,36 \pm 0,31$ ans et de poids moyen de $5,21 \pm 0,49$ kg, ont participé à cette étude. Ils ont été hébergés dans les mêmes conditions que décrites dans la Partie I 4.1.

14.2. Production des fibres d'alpha-synucléine

Les fibres d'alpha-synucléine WT nous ont été fournies par notre collaborateur Ronald Melki. Elles ont été générées *in vitro* à partir de monomères sous différentes conditions expérimentales (pH, température, agitation). Les souches fibrillaires d'alpha-synucléine WT FIB et RIB sont les mêmes que celles injectées chez le rat précédemment (Peelaerts et al., 2015) et leur méthode de production est donc précisément décrite dans (Bousset et al., 2013). Succinctement, de l'alpha-synucléine WT soluble a été incubée dans différents tampons (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM KCl pour les FIB et 5 mM Tris-HCl pH 7,5 pour les RIB) à 37 °C sous agitation continue dans un thermomixeur Eppendorf réglé à 600 r.p.m. L'assemblage a été surveillé en continu dans un spectrofluorimètre Cary Eclipse (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) en présence de Thioflavine T (15 mM).

14.3. Production des extraits de LB

Les extraits de LB de patients, fournis par notre collaborateur Erwan Bezard, sont les mêmes que ceux injectés chez le primate précédemment (Recasens et al., 2014) et leur méthode de production est donc précisément décrite dans (Bourdenx et al., 2020). Brièvement, les échantillons ont été obtenus à partir de cerveaux de trois patients atteints de MP sporadique (présentant une pathologie LB nigrale évidente à l'examen neuropathologique) provenant de la Brain Bank de GIE NeuroCEB. La SNpc a été disséquée et les tissus ont été homogénéisés dans un tampon avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase. Pour la purification des LB, un gradient de saccharose a été préparé. L'homogénat a été déposé sur le gradient et centrifugé à 160 000g pendant 3 heures à l'aide d'un rotor SW 32.1 (Beckman Coulter). Les fractions ont été collectées et analysées pour la présence d'agrégats d'alpha-synucléine par test de retardement

de filtre. Une caractérisation plus poussée des fractions LB a été effectuée par immunofluorescence, quantification ELISA de l'alpha-synucléine et microscopie électronique.

14.4. Chirurgie

Les chirurgies ont eu lieu dans les mêmes conditions que décrites dans la partie II 4.3. Les vecteurs viraux ont été injectés en utilisant un micromanipulateur (Kopf, Allemagne), une micro pompe, un micro-contrôleur (KDS) et une seringue en verre Hamilton de 100µL (pour les singes LB) ou 10µL (pour les singes FIB and RIB), avec une aiguille stérile stérile 28G de de 50mm de long. Les animaux ont été injectés bilatéralement dans le putamen post-commissural moteur. Les paramètres d'injection sont détaillés dans le **tableau 13**.

Tableau 13 : Paramètres d'injection de l'étude sur la caractérisation d'un modèle alpha-synucléine chez le primate non-humain.

	LB (n=2)	FIB (n=1)	RIB (n=1)
Mass protein injected	2,57µg		135µg
Concentration	12,88pg/µL		5µg/µL
Volume per site	50µL		6,75µL
Injection sites	Post commissural putamen (AC-1 and AC-4) bilaterally		
Total volume	200µL		27µL
Rate	3µL/min		

14.5. Imagerie IRM

Des images IRM ont été acquises dans les mêmes conditions que décrites dans la partie II 4.5 à baseline afin de déterminer précisément les coordonnées des sites d'injection. Les mêmes séquences anatomiques ont été acquises post-injection pour recalage avec les images TEP et vérification des injections en termes de positionnement et toxicité de l'inoculat (œdème).

14.6. Imagerie TEP

L'imagerie TEP a été utilisée pour caractériser le métabolisme cérébral via l'utilisation de glucose et l'intégrité du système dopaminergique via l'activité de l'enzyme AADC après l'inoculation des différentes souches d'alpha-synucléine. Pour cela, deux traceurs ont été respectivement considérés : le [18F] FDG et le [18F] FMT. Les examens TEP ont été réalisés à baseline puis à 6, 9, 12 et 18 mois après inoculation, dans les mêmes conditions que décrites dans la partie II 4.6.

14.7. Évaluation du comportement moteur

L'évaluation du comportement moteur (score clinique et activité motrice spontanée) a été réalisée dans les mêmes conditions que décrites dans la partie I 4.3, afin de caractériser l'impact fonctionnel de l'inoculation de différentes souches d'alpha-synucléine. Le comportement moteur a été évalué à baseline (moyenne de trois vidéos) puis à 6, 9, 12 et 18 mois après inoculation, dans les mêmes conditions que décrites dans la partie I 4.3 (une vidéo par timepoint).

14.8. Collection des tissus

Les singes ont été sacrifiés 18 mois après la chirurgie afin de réaliser des analyses histologiques et biochimiques de leurs tissus cérébraux. Les animaux ont d'abord été anesthésiés à la kétamine (1 mg/kg) et xylazine (0,5 mg/kg) puis ils ont été profondément anesthésiés avec du pentobarbital (100 mg/kg, i.v.). Les animaux ont été perfusés par voie transcardiaque avec 0,9 % de NaCl (contenant 1 % d'héparine) suivi de 4 % de paraformaldéhyde conformément aux directives de l'Association européenne des médecins vétérinaires. Les cerveaux ont été prélevés rapidement après la mort. Chaque cerveau a été disséqué le long de la ligne médiane dans une matrice glacée et chaque hémisphère a été divisé en trois parties. L'hémisphère droit a été post-fixé une semaine dans 10 vol/tissu de paraformaldéhyde 4% à 4°C, cryoprotégé en deux gradients successifs de 20 puis 30% de sucrose dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) avant d'être congelé par immersion dans un bain d'isopentane (-50°C) pendant au moins 5 min et conservé immédiatement à -80°C jusqu'au sectionnement pour analyse histologique. L'hémisphère gauche a été divisé en tranches de 4 mm à l'aide d'une hémi-matrice glacée et punché pour les analyses biochimiques sur tissu frais. Le cortex cingulaire, le caudé, le putamen, le globus pallidus, l'amygdale et la SN ont été punchés à l'aide d'un poinçon à biopsie de 3 mm ou disséqués en entier selon la forme de la structure puis ils ont été directement congelés sur de la carboglace. La partie restante de la tranche a été immédiatement congelée sur de carboglace et conservée à -80°C.

14.9. Analyses histologiques

Les analyses histologiques ont été initialement effectuées à Bordeaux par notre collaborateur Erwan Bezard et son équipe. Cependant, j'ai réeffectué certaines d'entre elles au laboratoire (marquage AADC et TH striatal) afin de pouvoir quantifier les marquages histologiques sur un plus grand nombre de coupes. La pathologie alpha-synucléine a été évaluée par des marquages immunohistochimiques de l'alpha-synucléine non-phosphorylée et l'alpha-synucléine phosphorylée Ser129 tandis que l'intégrité de la voie nigrostriatale a été évaluée par les marquages immunohistochimiques de la TH et de l'AADC. En bref, les sections flottantes ont été incubées avec un anticorps dirigé contre la TH (Immunostar, 22941, 1:500), l'AADC (Millipore, AB136, 1:500), l'alpha-synucléine (Thermo Scientific, Syn211 MAS-12272, 1:1000) ou l'alpha-synucléine ser-129 phosphorylée (Elan, 11A5, 1:10000). Après une nuit à température ambiante, les coupes ont été incubées avec le système anti-espèces peroxydase EnVision TM (Dako) suivi d'une visualisation à la 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Les coupes ont ensuite été montées sur des lames, déshydratées et recouvertes d'une lamelle. Les colorations ont été quantifiées par densité optique. Les sections ont été numérisées dans un scanner haute résolution Epson expression 10000XL

et les images ont été utilisées dans le logiciel open source ImageJ pour comparer les niveaux de gris dans chaque région d'intérêt. Tous les niveaux de marquages ont été comparés à ceux de trois singes contrôles. Lors des analyses complémentaires effectuées au laboratoire, les niveaux de marquages dans le caudé et le putamen ont été comparés à celui d'un singe contrôle pour la TH et à celui du cortex pour l'AADC. Les cellules de la SN TH-positives ont été comptées par stéréologie, en aveugle de la condition expérimentale, à l'aide d'un microscope motorisé Leica DM6000B couplé au logiciel Mercator (ExploraNova). Le SN a été délimité pour chaque lame et des sondes de comptage stéréologique ont été appliquées sur la carte obtenue (taille des sondes de 100 X 80 μm espacées de 600 X 400 μm). Chaque cellule TH-positive avec son noyau inclus dans la sonde a été comptée. La méthode du fractionnement optique a finalement été utilisée pour estimer le nombre total de cellules TH-positives dans le SNpc de chaque hémisphère de singe. Ce nombre de cellules TH-positives a été comparé à ceux de trois singes contrôles.

14.10. Analyses biochimiques

Les analyses biochimiques ont été réalisées au laboratoire par l'équipe de Ronald Melki. Des homogénats de cerveau provenant de punches ont été utilisés pour effectuer un test cisbio HTRF, qui permet de mesurer les niveaux d'alpha-synucléine agrégée, et pour effectuer un test d'amplification cyclique des protéines (PMCA – protein misfolding cyclic amplification), qui permet d'évaluer quantitativement la capacité d'amplification des différentes souches d'alpha-synucléine. Le test Cisbio FRET (Cisbio, Codolet, France, cat. # 6FSYNPEG) a été utilisé pour quantifier l' α -syn phosphorylée dans les homogénats de cerveau, en suivant les recommandations du fabricant. Brièvement, les homogénats cérébraux ont été dilués à 2 % (poids : volume) dans un tampon de lyse fourni dans le kit HTRF. 16 μL de chaque homogénat de cerveau dilué ont été chargés dans une plaque à 96 puits et mélangés avec 4 μL des anticorps donneurs et accepteurs FRET dans le kit. La plaque a été scellée avec un film (CmlAB, Esbjerg, Danemark, cat. # 13076-9P-500) et incubée pendant 20 h à 20 C sans agitation dans un Thermomixer confort (Eppendorf, Montesson, France). Après incubation, le FRET résolu dans le temps a été mesuré lors d'une excitation à 337 nm en utilisant un lecteur de plaques (CLARIOstar, BMG Labtech, Ortenberg, Allemagne). Le signal HTRF a été enregistré à deux longueurs d'onde différentes (665 nm et 620 nm). La quantité de α Syn agrégée a été dérivée du rapport de fluorescence de 665/620 nm et multipliée par 10 000. Le PMCA a été utilisé pour quantifier la capacité d'amplification des différentes souches d'alpha-synucléine. Cette analyse n'a pas encore été réalisée pour l'animal LB2. En bref, les homogénats de tissus fixés ont été dilués dans du tampon PMCA (150 mM de KCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5) contenant des monomères d' α Syn (100 μM) à une concentration finale de 2 % (poids : volume), équivalant à 6 mg de tissu, comme décrit précédemment pour les tissus non fixés. L'échantillon a été séparé dans deux tubes de barrettes PCR (BIOplastics, Landgraaf, Pays-Bas). L'amplification PMCA a été réalisée à l'aide du générateur Q700 et d'un pavillon 431MPX (Qsonica, Fisher Scientific, Illkirch, France). La puissance du klaxon a été réglée à 30 % de l'amplitude maximale. Le programme d'amplification consistait en 15 s de sonication et une pause de 5 min à 31 C. Toutes les heures, 5 μL ont été prélevés de chaque tube et dilués dans 300 μL de 10 μM de Thioflavine T (ThT). L'amplification a été suivie en mesurant la fluorescence ThT à l'aide d'un spectrophotomètre de fluorescence Cary Eclipse (Agilent, Les Ulis, France) avec une longueur d'onde d'excitation et d'émission fixée à 440 nm et 480 nm, respectivement. Les essais Cisbio et PMCA ont été réalisés en duplicat et les données obtenues ont été comparées à des échantillons de patients comme référence de la situation clinique (tissus de la banque française de

cerveaux NeuroCEB). L' α -synucléine a été quantifiée à l'aide d'un test de retardement par filtration. Les homogénats de cerveau (0,5 mg) ont été immobilisés sur des membranes d'acétate de cellulose (taille de pore de 0,2 μ m, Millipore Corp., Bedford, MA) par filtration à l'aide d'un appareil de filtration à fente à 48 fentes (GE Healthcare). Les membranes ont été bloquées dans du lait écrémé séché à 5% et sondées avec l'anticorps anti- α -synucléine 4B12 (Biolegend, cat# 807801) ou des anticorps polyclonaux de lapin immunopurifiés ou l'anticorps anti-P-S129 α -synucléine 81A (Millipore, cat# MABN826) ou l'anticorps anti-P-S129 α -synucléine EP1536Y (abcam, cat# ab51253). Après un lavage avec du TBST, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris conjugué à la HRP (Invitrogen, cat # A28177) pour les anticorps 4B12 et 81A ou avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à la HRP (Invitrogen, cat # A27036) pour les anticorps EP1536Y et polyclonaux pendant 1 h à température ambiante. Les protéines ont été visualisées à l'aide des réactifs ECL (Pierce, USA).

14.11. Analyses statistiques

Le faible nombre d'animaux dans ces études pilotes ne permet pas d'effectuer des analyses statistiques.

15. Résultats

15.1. L'impact fonctionnel induit

Pour déterminer si les différentes caractéristiques *in vitro* des espèces α -syn se reflètent dans l'altération fonctionnelle *in vivo*, nous avons inoculé deux souches différentes d'alpha-synucléine FIB (n=1) et RIB (n=1), en parallèle avec des extraits de LB de patients atteints de MP (n=2), dans le putamen moteur de singes cynomolgus. Le suivi *in vivo* a été effectué à la fois par des examens TEP18F-FDG pour évaluer l'impact général sur le métabolisme cérébral du glucose et par l'évaluation de l'activité locomotrice spontanée.

Lors des examens TEP 18F-FDG, les Ki moyens (droite et gauche) ont été évalués dans un grand nombre de régions dont le noyau caudé, le putamen, le pallidum, le thalamus, le cortex cingulaire, le cortex occipital, le cortex pariétal, le cortex temporal ou encore le cortex frontal. Seuls les résultats du noyau caudé et du putamen sont présentés ici puisqu'ils correspondent aux régions plus proches du site d'injection mais les résultats sont comparables dans les autres régions. Les Ki à 6, 9, 12 et 18 mois ont été comparés aux Ki moyens à baseline chez les mêmes animaux (**Figure 52 B**). Les images paramétriques des timepoints baseline, 9 et 18 mois sont représentés dans la (**Figure 52 A**). Les résultats de cette analyse montrent que les animaux inoculés avec LB montrent une baisse à 6 mois post-injection qui se stabilise (LB1) ou continue à se réduire dans le temps (LB2). L'animal injecté avec FIB montre aussi une baisse des Ki à 6 mois post-injection qui devient beaucoup plus prononcée à partir de 9 mois post-injection et reste stable jusqu'à 18 mois post-injection (-40% à -50%). L'animal RIB a une diminution progressive des Ki jusqu'à 12 mois post-injection (-55%) qui se stabilise à 18 mois post-injection. Il est intéressant de noter que la réduction des Ki est similaire dans le putamen, qui a été directement injecté avec les différentes

souches d' α -syn, et le caudé (non injecté), ainsi que les autres structures analysées. Ces résultats suggèrent que le métabolisme cérébral est altéré par la toxicité des différentes souches injectées dans un premier temps puis une stabilisation ou une légère récupération peut être observée suivant des cinétiques différentes selon l'espèce d'alpha-synucléine injectée.

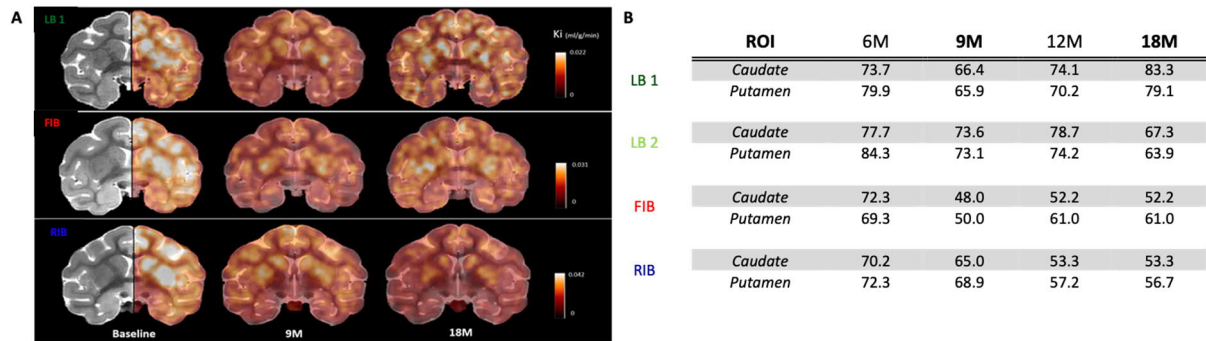


Figure 52 : Suivi *in vivo* par imagerie TEP 18F-FDG après injection de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNH.

A) Images paramétriques de TEP 18F-FDG à baseline, 9 et 18 mois (M) post-injection. Les images paramétriques sont recalées sur une image anatomique IRM visible en gris sur la première colonne. Les échelles Ki vont du noir (pas de fixation) au blanc (fixation maximale). **B)** Pourcentages des valeurs de Ki dans le caudé et le putamen à 6, 9, 12 et 18 mois (M) après injection par rapport à baseline. ROI = region of interest. LB = PNH inoculés avec les corps de Lewy, FIB = PNH inoculé avec les fibrilles et RIB = PNH inoculé avec les rubans.

La locomotion spontanée des animaux a été évaluée à 6, 9, 12 et 18 mois post-injection afin de définir si l'inoculation striatale de différentes espèces d' α -syn est capable d'induire un phénotype moteur chez le PNH. Les TDM de chaque timepoint ont été évaluées (une vidéo) et comparées à la TDM moyenne à baseline (sur trois vidéos). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage par rapport à baseline (**Figure 53**). Globalement, les TDMs ayant été évaluées que sur une vidéo par mois, on ne peut parler que de tendances. Nous avons observé à 18 mois post injection une diminution de l'activité locomotrice chez les 4 animaux, moins marquée pour les animaux LB (-10,34% et -19,59%) que pour le FIB (-30%) et RIB (-59,65%). Ces résultats suggèrent que l'impact des inoculations sur le phénotype moteur est plus robuste à des temps plus tardifs et dépend fortement de la souche d' α -syn injectée.

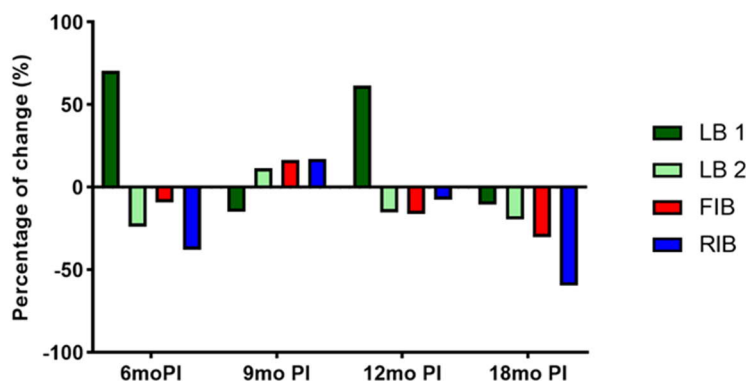


Figure 53 : Suivi in vivo de la locomotion spontanée à 6, 9, 12 et 18 mois post-injection (moPI) de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNHs adultes.

Quantification des changements dans l'activité motrice spontanée via Ethovision® après inoculation. Les changements ont été calculés à partir de la TDM obtenue par une vidéo à chaque timepoint. Les données sont exprimées comme un pourcentage relatif à baseline (moyenne de trois vidéos).

15.2. La neurotoxicité dopaminergique induite

La neurotoxicité dopaminergique induite par l'inoculation des différentes espèces d' α -syn dans le striatum de primate a été évaluée *in vivo* par TEP 18F-FMT afin de mesurer l'activité de l'enzyme AADC *in vivo* et par des marquages immunohistochimiques AADC et TH en post-mortem.

Lors des examens TEP 18F-FMT, les Ki moyens (droite et gauche) dans les mêmes régions d'intérêt ont été évalués à 6, 9, 12 et 18 mois et comparés aux Ki moyens à baseline (**Figure 54 A**). Les résultats montrent que chez les deux animaux injectés avec les LB la fixation du traceur n'est pas modifiée au niveau du caudé mais ne se comporte pas de la même façon au niveau du putamen. Le LB1 montre une diminution dès 6 mois post-injection alors que LB2 semble montrer une légère baisse à 18 mois post-injection uniquement. En ce qui concerne les souches synthétiques, l'animal injecté avec FIB ne montre pas de diminution significative de la fixation du traceur au niveau du caudé ou du putamen dans le temps. Le primate injecté avec RIB en revanche montre une diminution dans le putamen à partir de 6 mois post-injection qui continue à décroître dans le temps. Il est intéressant de noter que la fixation dans le caudé est très affectée à partir de 12 mois post-injection aussi.

Les niveaux de marquage histologique de l'enzyme AADC au niveau du striatum à 18 mois post-injection montre qu'il n'y a aucune diminution du marquage dans le caudé ou le putamen comparé au cortex (cortex adjacent utilisé comme contrôle interne) pour tous les animaux (**Figure 54 B et C**). Les marquages AADC semble plus forts pour les animaux FIB et RIB que pour les animaux LB.

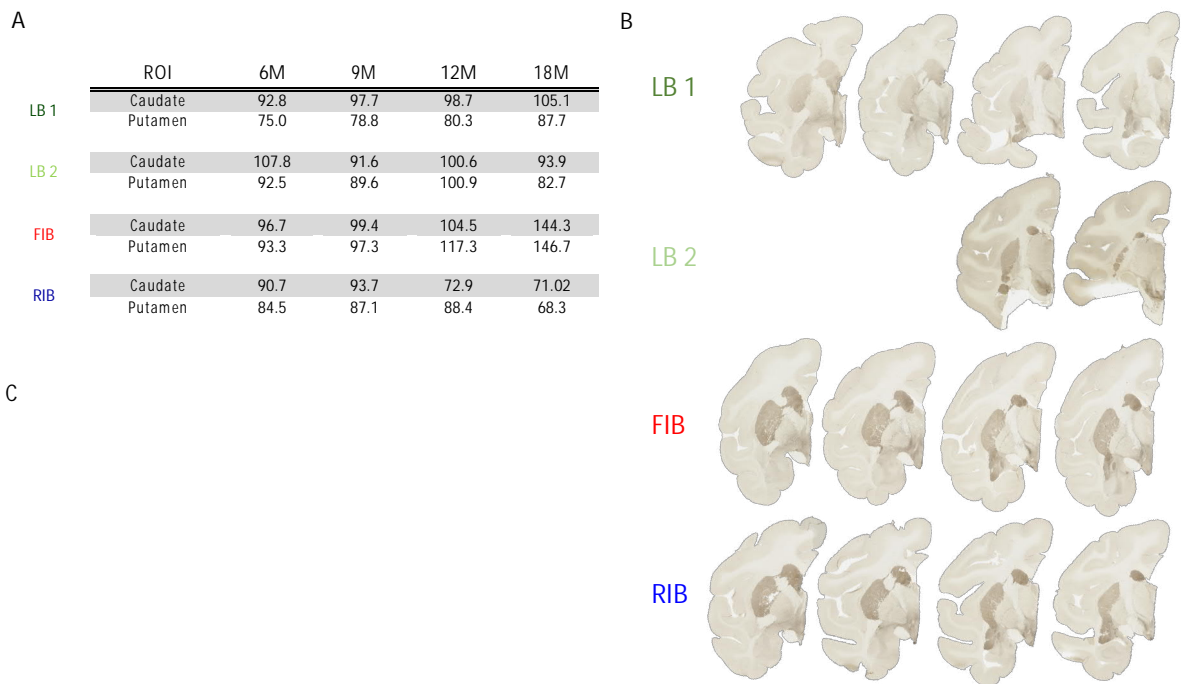


Figure 54 : Changements dans l'activité et l'expression de l'enzyme AADC induits par l'injection de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNH.

A) Pourcentages des valeurs de Ki de TEP 18F-FMT à 6, 9, 12 et 18 mois (M) après injection par rapport à baseline.

B) Images coronales représentatives du marquage AADC au niveau du striatum. **C)** Quantification du marquage AADC par densitométrie optique dans le noyau caudé et le putamen par rapport au cortex. ROI = region of interest. LB = PNH inoculés avec les corps de Lewy, FIB = PNH inoculé avec les fibrilles et RIB = PNH inoculé avec les rubans.

L'atteinte des fibres terminales dopaminergiques a été analysée par la quantification du marquage histologique de l'enzyme TH dans le striatum et comparé au contrôle (**Figure 55 A**). Le marquage TH est globalement similaire à celui des contrôles que ce soit dans le putamen ou le noyau caudé (**Figure 55 B**). Pour évaluer la perte neuronale dopaminergique dans le SN, le nombre de cellules TH positives a été quantifié par stéréologie et comparé aux contrôles (**Figure 55 C**). Tous les animaux présentent une légère perte de cellules TH positives qui est plus marquée pour les animaux injectés avec les LB (-30% vs 40% pour le LB1, -60% pour le LB2, -10% pour le FIB et -15% pour le RIB). Nous pouvons également observer des changements morphologiques au niveau des cellules marquées à la TH de la SN avec des varicosités (semblables à ce que nous avons l'habitude de voir chez les primates MPTP) qui indiquent un début de neurodégénérescence (**Figure 55 A**). Ces résultats suggèrent qu'il existe un début de neurotoxicité dopaminergique TH dans la SN de ces animaux mais que les niveaux ne sont pas assez importants pour affecter l'expression de la TH dans le striatum.

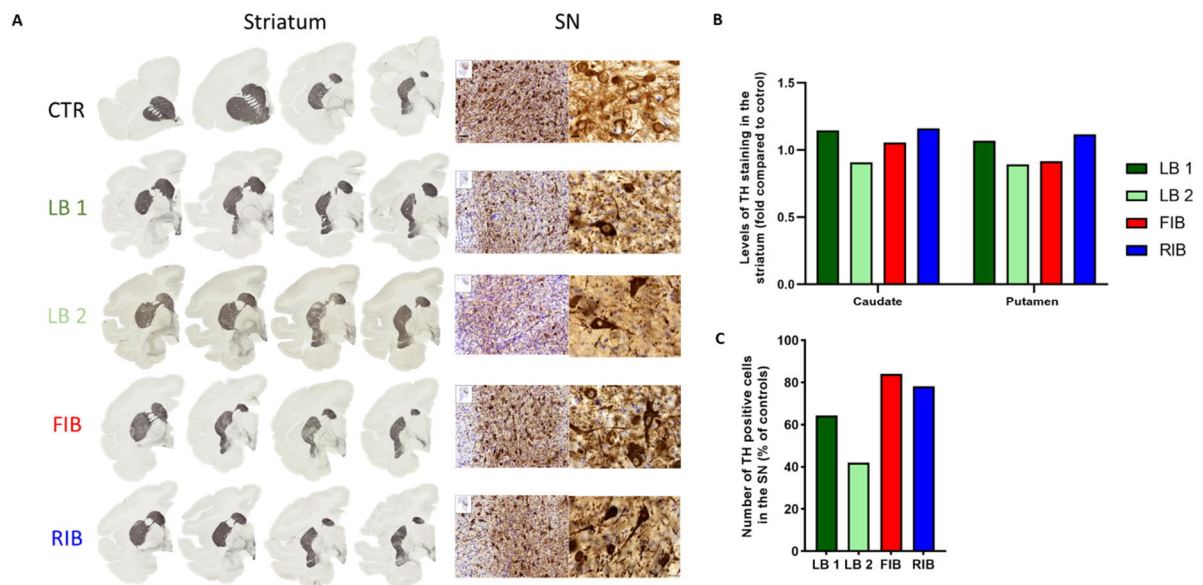


Figure 55 : Modifications de l'expression de la TH induites par l'injection de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNH 18 mois post injection.

A) Images coronales représentatives du marquage TH au niveau du striatum et de la SN. **B)** Quantification du marquage TH par densitométrie optique par rapport au contrôle dans le noyau caudé et le putamen. **C)** Quantification stéréologique du nombre de cellules TH positives dans la SN en pourcentage des contrôles. SN = substantia nigra, LB = NHP inoculé à corps de Lewy, FIB = NHP inoculé aux fibrilles et RIB = NHP inoculé par rubans. Scale bars = 10mm (à gauche) et 40µm (à droite).

15.3. La pathologie alpha-synucléine induite

Pour explorer la pathologie liée à l' α -syn en fonction de l'espèce injectée, nous avons évalué les capacités de phosphorylation, d'agrégation et d'amplification des différentes espèces d' α -syn dans plusieurs régions d'intérêt (cortex cingulaire, caudé, putamen, globus pallidus, amygdale et SN).

Tout d'abord nous avons évalué l'expression de l'alpha-synucléine et de l'alpha-synucléine phosphorylée P-S129 toxique par quantification du marquage immunohistochimique dans les régions d'intérêt et nous l'avons comparé à des témoins. Les résultats sont représentés sous forme de heatmap (**Figure 56 A et B**). Globalement, nous n'avons observé aucune augmentation prononcée de l'expression de l'alpha-synucléine par rapport aux témoins dans aucune des régions d'intérêt chez ces quatre animaux. En revanche, il existe une accumulation d'alpha-synucléine phosphorylée pathogénique très marquée dans le GP et la SN de l'animal LB2 et dans le cortex cingulaire et dans le putamen de l'animal LB1 alors qu'il n'y a qu'une très légère accumulation voire une diminution des taux d'alpha-synucléine phosphorylée pour les animaux FIB et RIB. Même si une accumulation d'alpha-synucléine non phosphorylée et phosphorylée a été observée, aucune inclusion de type LB n'a été observée chez aucun de ces animaux. Nous avons également effectué une quantification par filter trap des quantités d'alpha-synucléine et d'alpha-synucléine phosphorylée P-S129 présentes dans les homogénats de ces mêmes régions d'intérêt (**Figure 56 C**). Les résultats des homogénats du cortex cingulaire d'un patient parkinsonien sont

représentés à des fins de comparaison. L'alpha-synucléine est plus abondante dans toutes les régions cérébrales de tous les animaux injectés comparé au tissu PD. L'accumulation d'alpha-synucléine est globalement plus élevée pour l'animal RIB (en particulier dans le cortex cingulaire et l'amygdale) par rapport aux animaux LB et FIB. En revanche, l'alpha-synucléine phosphorylée est moins abondante dans toutes les régions de tous les animaux que dans le tissu PD. De la même façon, les niveaux d'alpha-synucléine phosphorylée sont plus élevés pour les animaux LB2 et RIB par rapport aux animaux LB1 et FIB. Ces résultats montrent que le pattern de phosphorylation est différent entre les différentes espèces d'alpha-synucléine.

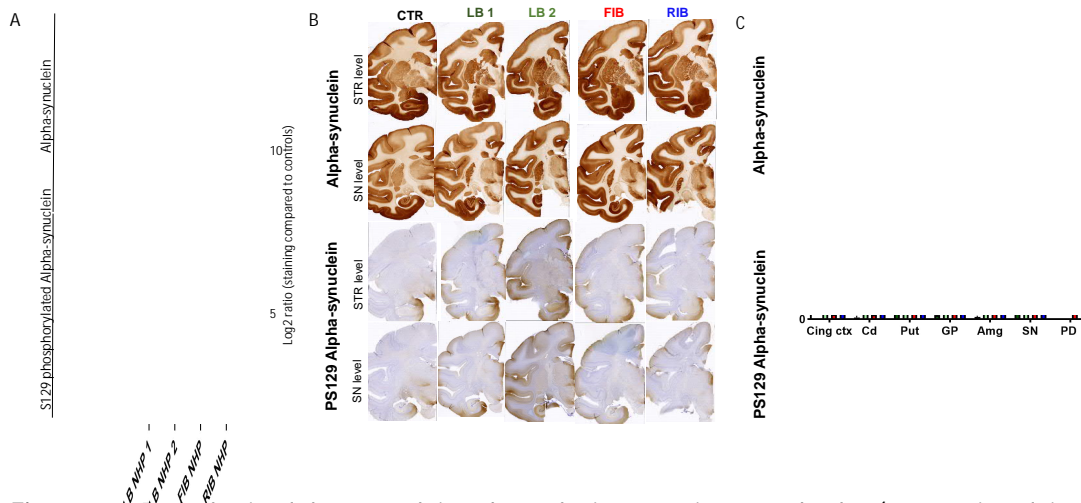


Figure 56 : Pathologie alpha-synucléine dans plusieurs régions cérébrales (cortex cingulaire, le noyau caudé, le putamen, le globus pallidus, le cortex enthorinal, l'amygdale, la substance noire induite par l'injection de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNH 18 mois post injection.

A) Heatmap des rapports log2 des niveaux de marquage immunohistochimique d'alpha-synucléine et d'alpha-synucléine phosphorylée par rapport à des singes sains (n = 3) **B)** Scans représentatifs du marquage alpha-synucléine et alpha-synucléine P-129 aux niveaux du striatum (STR) et de la Substance noire (SN). **C)** Quantifications par filter trap de l'alpha-synucléine et de l'alpha-synucléine phosphorylée. Cortex cingulaire (Cing ctx), Noyau caudé (Cd tail), Putamen ventro-médial (Put-VM), Putamen Ventro-latéral (Put-VL), Putamen dorso-médial (Put-DM), Amygdale (Amg ante) et Substance noire (SN). CTR NHP = primates non humains non inoculés, LB NHP = primate non humain inoculé avec des corps de Lewy, FIB NHP = primate non humain inoculé avec fibrilles et RIB NHP = primate non humain inoculé avec des rubans.

Pour déterminer la capacité d'agrégation de chaque souche d' α -syn, nous avons déterminé la quantité de protéine agrégée par le test cisbio HTRF dans les homogénats de plusieurs régions du cerveau et nous l'avons comparée aux homogénats cérébraux de patients atteints de MP. La distribution de l'agrégation de l' α -syn est représentée en heatmaps neuroanatomiques pour l'évaluer de manière semi-quantitative (**Figure 57 A**). L'alpha-synucléine agrégée est présente dans le putamen, le globus pallidus et la substance noire de tous les animaux mais dans des proportions différentes. Elle est majoritairement présente dans le globus pallidus des animaux injectés avec les LB alors qu'elle est majoritairement présente dans la SN de l'animal injecté avec les FIB et dans le putamen de l'animal injecté avec les RIB. La capacité de chaque souche d'alpha-synucléine de recruter des monomères d'alpha-synucléine endogènes pour s'amplifier a été quantifiée par PMCA dans des homogénats provenant des mêmes régions cérébrales (à l'exception du noyau caudé) et comparée à des homogénats cérébraux provenant de témoins humains ou de patients atteints de MP. Nous avons résumé les niveaux d'amplification des différentes souches dans les différentes régions cérébrales de manière semi-quantitative dans un tableau (**Figure 57 B**). L'amplification est homogène entre les différentes régions de l'animal RIB. Cependant

différents niveaux d'amplification ont été observés selon la région analysée pour l'animal LB1 et FIB. Une forte amplification a été observée dans le cortex cingulaire, le putamen et le globus pallidus de l'animal FIB et dans le cortex cingulaire de l'animal LB. Ces résultats suggèrent que la pathologie induite par l'alpha-synucléine peut s'étendre/se propager dans des régions du cerveau éloignées du site d'injection et d'une manière spécifique à la souche.

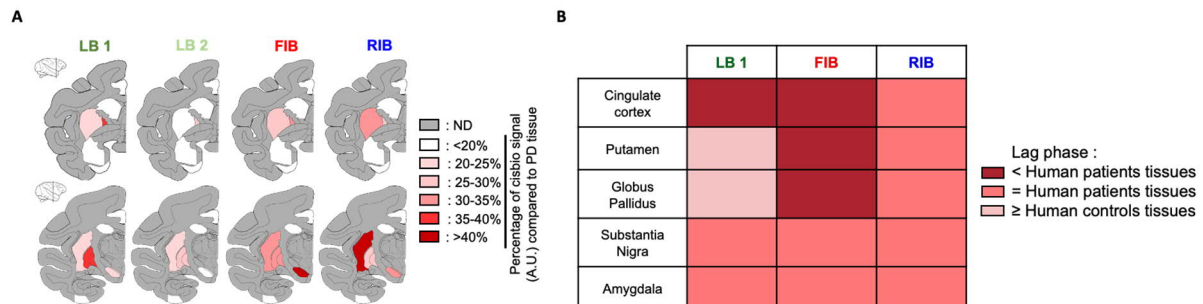


Figure 57 : Pathologie alpha-synucléine dans plusieurs régions cérébrales (cortex cingulaire, le noyau caudé, le putamen, le globus pallidus, le cortex entorhinal, l'amygdale, la substance noire) induite par l'injection de LB, FIB et RIB dans le striatum de PNHs à 18 mois post-injection.

A) Heatmaps représentant le pourcentage, basé sur le signal de l'analyse de cisbio, d'alpha-synucléine agrégée par rapport aux tissus PD. **B)** Résumé de la capacité de d'amplification, basé sur les résultats de l'amplification PMCA. La phase de latence du deuxième cycle d'amplification, qui est le temps précédant l'augmentation de la fluorescence ThT, a été comparé à des échantillons de patients atteints de MP et de témoins humains. Les tissus humains proviennent du cortex cingulaire. CTR NHP = primates non humains non inoculés, LB NHP = primate non humain inoculé à corps de Lewy, FIB NHP = primate non humain inoculé avec fibrilles et RIB NHP = primate non humain inoculé par rubans.

16. Discussion

Cette étude préliminaire nous a permis d'établir une preuve de concept sur :

- La capacité différentielle des 3 souches d' α -syn à s'amplifier, s'agréger et se propager dans le cerveau du primate non-humain, et
- La pertinence et la sensibilité de nos outils translationnels pour détecter des changements.

Les résultats du suivi longitudinal en imagerie *in vivo* de cette étude ont révélé une atteinte du métabolisme du glucose plus prononcée pour les animaux ayant reçu une injection de FIB et de RIB comparé à ceux ayant reçu une injection de LB. Cette réduction était bilatérale et marquée non seulement dans le site d'injection (putamen) et les sites adjacents (noyau caudé, pallidum), mais aussi dans le thalamus, le cortex cingulaire, le cortex occipital, le cortex pariétal, le cortex temporal ou encore le cortex frontal. Ceci est indicatif d'une compensation globale du métabolisme neuronale et suggère un dysfonctionnement précoce.

En absence d'un marqueur histologique approprié pour caractériser ce dysfonctionnement en lien avec l'imagerie PET 18F-FDG, on a exploré des changements au niveau dopaminergique attendus suite à

l'inoculation intra-putaminale des souches d' α -syn. En effet, les analyses histologiques ont révélé une réduction du nombre de cellules TH positives dans la SN et donc une atteinte du système dopaminergique, mais pas dans les mêmes animaux qui présentaient les baisses les plus prononcées en métabolisme neuronale du FDG. Cependant, même si le comptage stéréologique a montré une réduction plus importante des neurones TH positifs de la SN des animaux LB, la morphologie des neurones dopaminergiques est clairement affectée chez les quatre animaux, ce qui peut entraîner une perte de fonction et précéder leur mort.

De plus, nous n'avons pas observé de perte de marquage TH chez nos quatre animaux qui serait le signe d'une altération au niveau des afférences striatales des neurones dopaminergiques de la SN. C'est également le cas dans l'étude par Chu et al. où ils observent même une légère augmentation de l'expression de la TH striatale (8-15% d'augmentation) et une réduction de 29,3% des cellules TH de la SN (Chu et al., 2019). Nos résultats sont donc cohérents avec un degré de lésion nigrostriatale inférieur au seuil d'apparition des symptômes parkinsoniens (Bezard et al., 2001) et, en conséquence, aucune altération robuste du comportement moteur est attendue. En effet, contrairement à l'étude chez le rat, nous n'avons pas observé d'altération significative du comportement moteur spontané. Ces résultats sont aussi en accord avec d'autres études ayant injecté des fibres synthétiques ou des LB chez le primate et qui ont observé une propagation lente de la pathologie et de la dégénérescence dopaminergique avec pas ou seulement de légers déficits du comportement moteur (Recasens et al., 2014; Shimozawa et al., 2017; Chu et al., 2019; Arotcarena et al., 2020; Bourdenx et al., 2020). Il est intéressant de noter que nos données préliminaires de comportement moteur montrent une tendance plus marquée chez l'animal injecté avec les RIB au timepoint de 18moPI mais un nombre plus important d'animaux est nécessaire pour confirmer ce résultat.

Lors de notre étude, nous avons observé, via l'imagerie TEP 18F-FMT, que l'activité de l'enzyme AADC est plus fortement diminuée pour les animaux injectés avec les FIB et les RIB que pour les animaux injectés avec les LB. Or, lors des analyses histochimiques nous avons observé que ces animaux FIB et RIB sont ceux qui ont le marquage AADC le plus marqué. Cette différence peut paraître de premier abord surprenante mais peut s'expliquer par le fait que les marquages histologiques évaluent l'expression de la protéine alors que l'imagerie TEP évalue son activité. Or l'expression de la protéine peut être conservée mais l'activité altérée. En effet, l'alpha-synucléine pourrait inhiber l'activité de l'enzyme AADC en inhibant sa phosphorylation via l'activation de la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Tehrani et al., 2006). Cela pourrait d'ailleurs être également le cas pour l'enzyme TH via le même mécanisme (X. Peng et al., 2005; R. G. Perez et al., 2002). L'alpha-synucléine pourrait se lier au transporteur DAT et altérer sa distribution membranaire (F. J. Lee et al., 2001; Wersinger & Sidhu, 2003). Il a aussi été observé que la surexpression d'alpha-synucléine diminue l'absorption de la dopamine et augmente son efflux (Butler et al., 2015). L'alpha-synucléine pourrait aussi interagir avec VMAT2 réduisant son activité et altérant son transport dans les vésicules synaptiques. Enfin, l'alpha-synucléine pourrait interagir avec d'autres protéines qui contribuent à la régulation de la synthèse de la dopamine telles que ERK (extra-cellular signal regulated protein kinase) ou PKC (protein kinase C) (R. G. Perez et al., 2002). Il serait par conséquent intéressant d'utiliser d'autres traceurs d'imagerie TEP chez nos animaux dans le futur pour mieux caractériser le rapport entre l'agrégation et l'accumulation de l'alpha-synucléine phosphorylée et l'impact sur le système dopaminergique.

Concernant l'alphasynucléinopathie, les analyses biochimiques ont révélé que les différentes souches d' α -syn ont des capacités d'amplification différentes selon les régions, qu'elles se propagent de manière

spécifique à travers des régions éloignées du site d'injection, et qu'elles peuvent induire une toxicité via des phénomènes d'agrégation et de phosphorylation. Cette capacité d'amplification semble donc être en lien avec la structure des fibrilles d' α -syn.

Notre étude est la première, à notre connaissance, à comparer les propriétés pathologiques de différentes souches d'alpha-synucléine *in vivo* chez le primate. Bien que des études plus approfondies soient nécessaires sur un plus grand nombre d'animaux, nos résultats préliminaires représentent une preuve de concept des données générées chez le rat (Peelaerts et al., 2015) en montrant que nous sommes également capables d'induire des effets pathologiques chez le PNH. De plus, nos données chez les primates soutiennent l'hypothèse selon laquelle les différentes souches d'alpha-synucléine sous-tendent différents schémas de propagation de la pathologie α -syn et peuvent expliquer les différences entre alpha-synucléinopathies. Bien qu'ayant observé des phénomènes pathologiques tels que l'agrégation et la phosphorylation de l'alpha-synucléine dans de nombreuses régions cérébrales, nous n'avons pas observé d'inclusions de type LB, contrairement à ce qui a été observé chez le rongeur avec ces mêmes souches fibrillaires (Peelaerts et al., 2015) ou avec d'autres fibres synthétiques chez le primate (Chu et al., 2019). On ne peut pas, pour le moment, établir clairement le lien entre l'agrégation et phosphorylation de la protéine. Certaines études suggèrent que la phosphorylation véhicule l'agrégation alors que d'autres suggèrent que la phosphorylation a lieu pour libérer les agrégats pour leur élimination par la cellule (Chau, Ching, Schapira, & Cooper, 2009; Machiya et al., 2010; Oueslati, 2016; Oueslati, Schneider, Aebischer, & Lashuel, 2013).

Pris ensemble, nos résultats démontrent que des souches fibrillaires d' α -syn distinctes induisent une synucléinopathie spécifique à chaque souche, qui coïncide avec une toxicité et des atteintes dopaminergiques différentes et avec des altérations fonctionnelles mesurables chez les NHP. Les modèles qui en résultent semblent correspondre à un modèle de MP à un stade précoce ou prodromal qui serait très utile pour tester des biomarqueurs, radioligands contre l'alpha-synucléine et stratégies thérapeutiques du type « disease modifying ».

Cette étude était pour nous la première étape pour développer des modèles d'alpha-synucléinopathie chez le NHP. Les résultats de cette étude nous ont permis de lever des fonds (ANR + Fondation France Parkinson) pour continuer nos recherches et vont être soumis pour publication dans les prochaines semaines.

Suite à ces résultats prometteurs nous avons lancé une nouvelle étude en 2020 avec un design expérimental amélioré (**Tableau 14**). L'absence de toxicité directe des injections de LB, RIB ou FIB nous ont conduit à augmenter les sites d'injection dans le putamen sensori-moteur post commissural (trois sites d'injection). Les souches d'alpha-synucléine injectées ont aussi été modifiées pour favoriser une accélération de la pathologie. En effet, il a été possible d'isoler et caractériser des fibres d'alpha-synucléine pathologiques présentes dans les échantillons de cerveau des patients parkinsoniens (Fenyi et al., 2021; Van der Perren et al., 2020). Il est ainsi aujourd'hui possible d'amplifier des fibres de patients parkinsoniens qui sont potentiellement plus pertinentes que les fibres synthétisées dans le laboratoire (Fenyi et al., 2021). A notre connaissance c'est la première fois que l'inoculation de fibres amplifiées de patients sera évaluée chez le primate non-humain. Les effets de ces fibres seront comparés à ceux des fibres synthétisées dans le laboratoire qui remplaceront le benchmark LB.

De plus, il a été observé que la co-injection de vecteurs viraux surexprimant l'alpha-synucléine A53T dans la SN de rats (Peelaerts et al., 2015) accélère considérablement la neurodégénérescence et l'altération du comportement moteur. Par conséquent, on évaluera l'impact d'une co-injection d'un AAV-A53T dans la SN et des fibrilles dans le putamen de nos PNHs. Le nombre d'animaux par groupe (n=4) permettra de réaliser des statistiques et des groupes témoins seront aussi inclus (PBS et/ou des AAV-A53T).

Tableau 14 : Groupes d'injection de l'étude sur la caractérisation d'un modèle alpha-synucléine chez le primate non-humain.

	Group 1 (n=3)	Group 2 (n=3)	Group 3 (n=4)	Group 4 (n=4)	Group 5 (n=4)
Striatum					
Materiel injected	PBS		PD405		FIB
Concentration	-		10 µg/µL		10 µg/µL
Injection sites	Putamen (AC+1, AC-1 and AC-4)				
Volume per site	10 µL				
Total volume	60 µL				
Rate	3 µL/min				
Substantia nigra					
Materiel injected	PBS	AAV-A53T	PBS	AAV-A53T	PBS
Concentration		2,2x10 ¹³ vg/ml		2,2x10 ¹³ vg/ml	
Volume	20 µL				
Rate	3 µL/min				

Le protocole a également évolué (**Figure 58**). Afin de pallier à un possible phénomène de récupération, ces fibres (ou PBS) seront réinjectées 6 mois après la première injection. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une double inoculation à quelques mois d'intervalle sera réalisée chez le primate. L'imagerie TEP sera réalisée à trois timepoints, avant inoculation et à 6 et 12moPI avec les traceurs 18F-PE2I et 18F-Fallypride. Ces radioligands ont été choisis notamment pour avoir plus de spécificité par rapport au système nigro-striatal (vs le 18F-FDG qui est assez général). Le radiotraceur 18F-PE2I, reconnaît sélectivement la DAT au niveau des corps cellulaires de neurones dopaminergiques de la SN alors que le Fallypride a une forte affinité pour les récepteurs dopaminergiques post synaptiques D2 et D3 dans le striatum mais aussi en extra-striatal. Suite à la validation de la batterie de tests non-moteurs présentée dans la Partie I de ce manuscrit, le comportement moteur et non-moteur seront évalués suivant le même protocole, en incluant aussi le suivi de la température corporelle. A notre connaissance c'est la première fois que des NMS seront évalués dans un modèle d'inoculation de fibres alpha-synucléine.

Le suivi *in vivo* sera réalisé pendant un an avant l'euthanasie des animaux pour réaliser des analyses histologiques et biochimiques sur leurs tissus cérébraux.

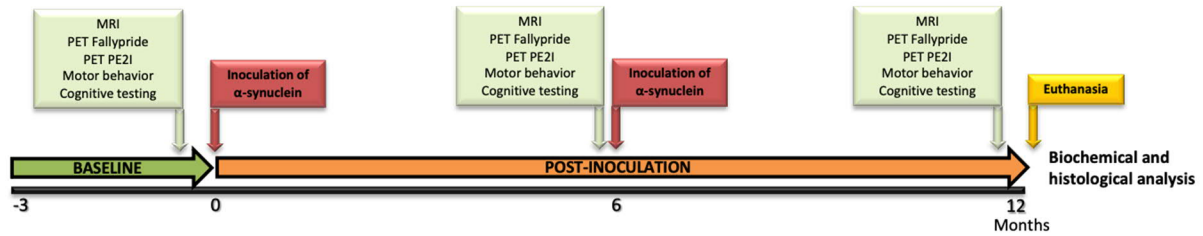


Figure 58 : Protocole expérimentale de l'étude sur la caractérisation d'un modèle alpha-synucléine chez le primate non-humain.

Cette nouvelle étude devrait nous permettre de confirmer les résultats préliminaires obtenus dans l'étude pilote et d'établir la première preuve de concept chez le primate non-humain de la possibilité de modéliser des alpha-synucléinopathies avec des souches structurellement différentes et bien caractérisées. L'impact de ces recherches serait de mieux comprendre les différences de progression dans des populations de patients dans l'espoir de pouvoir développer des biomarqueurs qui permettent de les stratifier précocement et correctement pour proposer des traitements plus ciblés. De plus, ces modèles pourraient servir pour évaluer l'efficacité thérapeutique de nouveaux traitements contre la MP et d'autres synucléinopathies.

CONCLUSION

Les objectifs de cette thèse étaient multiples :

- Élaborer, mettre en œuvre et valider des outils permettant l'exploration de déficits fonctionnels non-moteurs dans un modèle primate MPTP de la MP sévèrement symptomatique.
- Évaluer l'effet thérapeutique d'une thérapie génique régulable dans ce modèle primate de la MP et par la même occasion valider l'utilisation de nouveaux biomarqueurs dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de nouvelles thérapies.
- Développer, caractériser et valider un nouveau modèle de synucléinopathie chez le primate non-humain à l'aide des nouveaux biomarqueurs identifiés.

Ainsi, les résultats de cette thèse ont montré pour la première fois que :

- 1) Il est possible d'étudier les symptômes non-moteurs chez un modèle primate MPTP de la MP sévèrement symptomatique via des tests cognitifs sur écran tactile et le suivi du rythme circadien via la température corporelle.
- 2) Ces biomarqueurs permettent également d'évaluer l'amélioration des symptômes non-moteurs chez ce modèle après administration d'une thérapie génique contre la MP.
- 3) L'injection de vecteurs viraux surexprimant l'AADC, la TH et le CH1 dans le striatum de singe sévèrement parkinsonien de façon régulable semble efficace contre les symptômes moteurs et non-moteurs présents dans ce modèle, et permet de réguler l'expression des transgènes et donc la production de dopamine dans le cerveau.
- 4) Lorsque différentes souches d' α -syn sont inoculées dans le putamen de primates non-humains sains, elles semblent capables de s'agréger et se propager dans le cerveau suivant des patrons différents tels que décrit chez le rongeur auparavant. La caractérisation ultérieure de ces modèles pourrait ainsi être utile pour évaluer l'efficacité thérapeutique de stratégies visant à réduire le taux d'agrégats contenant de l' α -syn et pour valider des nouveaux biomarqueurs (en imagerie par ex) pour le diagnostic et la stratification des patients parkinsoniens.

L'ensemble de mes travaux de thèse vont ainsi contribuer à l'amélioration de l'évaluation préclinique de nouveaux modèles et de nouvelles thérapies pour la maladie de Parkinson chez le primate non-humain afin d'augmenter leur prédictivité.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbes, M., Lhommée, E., Thobois, S., Klinger, H., Schmitt, E., Bichon, A., . . . Krack, P. (2018). Subthalamic stimulation and neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease: results from a long-term follow-up cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *89*(8), 836-843. doi:10.1136/jnnp-2017-316373
- Accolla, E. A., & Pollo, C. (2019). Mood Effects After Deep Brain Stimulation for Parkinson's Disease: An Update. *Front Neurol*, *10*, 617. doi:10.3389/fneur.2019.00617
- Adams, R., Van Bogaert, L., & Van Der Eecken, H. (1961). [Nigro-striate and cerebello-nigro-striate degeneration. (Clinical uniqueness and pathological variability of presenile degeneration of the extrapyramidal rigidity type)]. *Psychiatr Neurol (Basel)*, *142*, 219-259.
- Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*, *3*(5), 383-394. doi:10.1038/nrn812
- Alam, P., Bousset, L., Melki, R., & Otzen, D. E. (2019). α -synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities. *J Neurochem*, *150*(5), 522-534. doi:10.1111/jnc.14808
- Alberico, S. L., Cassell, M. D., & Narayanan, N. S. (2015). The Vulnerable Ventral Tegmental Area in Parkinson's Disease. *Basal Ganglia*, *5*(2-3), 51-55. doi:10.1016/j.baga.2015.06.001
- Alexander, G. E., DeLong, M. R., & Strick, P. L. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*, *9*, 357-381. doi:10.1146/annurev.ne.09.030186.002041
- Almirall, H., Bautista, V., Sanchez-Bahillo, A., & Trinidad-Herrero, M. (2001). Ultradian and circadian body temperature and activity rhythms in chronic MPTP treated monkeys. *Neurophysiol Clin*, *31*(3), 161-170.
- Almirall, H., Pigarev, I., de la Calzada, M. D., Pigareva, M., Herrero, M. T., & Sagales, T. (1999). Nocturnal sleep structure and temperature slope in MPTP treated monkeys. *J Neural Transm (Vienna)*, *106*(11-12), 1125-1134. doi:10.1007/s007020050228
- Aron Badin, R., Spinnewyn, B., Gaillard, M. C., Jan, C., Malgorn, C., Van Camp, N., . . . Hantraye, P. (2013). IRC-082451, a novel multitargeting molecule, reduces L-DOPA-induced dyskinesias in MPTP Parkinsonian primates. *PLoS One*, *8*(1), e52680. doi:10.1371/journal.pone.0052680
- Arotcarena, M. L., Dovero, S., Prigent, A., Bourdenx, M., Camus, S., Porras, G., . . . Bezard, E. (2020). Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain*, *143*(5), 1462-1475. doi:10.1093/brain/awaa096
- Ascherio, A., Chen, H., Weisskopf, M. G., O'Reilly, E., McCullough, M. L., Calle, E. E., . . . Thun, M. J. (2006). Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *60*(2), 197-203. doi:10.1002/ana.20904
- Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol*, *15*(12), 1257-1272. doi:10.1016/s1474-4422(16)30230-7
- Aubert, I., Guigoni, C., Hakansson, K., Li, Q., Dovero, S., Barthe, N., . . . Bezard, E. (2005). Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol*, *57*(1), 17-26. doi:10.1002/ana.20296
- Azzouz, M., Martin-Rendon, E., Barber, R. D., Mitrophanous, K. A., Carter, E. E., Rohll, J. B., . . . Mazarakis, N. D. (2002). Multicistronic lentiviral vector-mediated striatal gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase, and GTP cyclohydrolase I induces sustained transgene expression, dopamine production, and functional improvement in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, *22*(23), 10302-10312. doi:10.1523/jneurosci.22-23-10302.2002
- Badin, R. A., Binley, K., Van Camp, N., Jan, C., Gourlay, J., Robert, C., . . . Hantraye, P. (2019). Gene Therapy for Parkinson's Disease: Preclinical Evaluation of Optimally Configured TH:CH1 Fusion for

- Maximal Dopamine Synthesis. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 14, 206-216. doi:10.1016/j.omtm.2019.07.002
- Balbastre, Y., Rivière, D., Souedet, N., Fischer, C., Hérard, A. S., Williams, S., . . . Delzescaux, T. (2017). Primatologist: A modular segmentation pipeline for macaque brain morphometry. *Neuroimage*, 162, 306-321. doi:10.1016/j.neuroimage.2017.09.007
- Bankiewicz, K. S., Eberling, J. L., Kohutnicka, M., Jagust, W., Pivrotto, P., Bringas, J., . . . Harvey-White, J. (2000). Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol*, 164(1), 2-14. doi:10.1006/exnr.2000.7408
- Bankiewicz, K. S., Forsayeth, J., Eberling, J. L., Sanchez-Pernaute, R., Pivrotto, P., Bringas, J., . . . Cunningham, J. (2006). Long-term clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC. *Mol Ther*, 14(4), 564-570. doi:10.1016/j.ymthe.2006.05.005
- Bardon, J., Kurcova, S., Chudackova, M., Otruba, P., Krahulik, D., Nevrlý, M., . . . Sivak, S. (2020). Deep brain stimulation electrode position impact on parkinsonian non-motor symptoms. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. doi:10.5507/bp.2020.034
- Barnett, R. (2016). Parkinson's disease. *Lancet*, 387(10015), 217. doi:10.1016/s0140-6736(16)00049-0
- Barraud, Q., Lambrecq, V., Forni, C., McGuire, S., Hill, M., Bioulac, B., . . . Ghorayeb, I. (2009). Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. *Exp Neurol*, 219(2), 574-582. doi:10.1016/j.expneurol.2009.07.019
- Bartus, R. T., Baumann, T. L., Siffert, J., Herzog, C. D., Alterman, R., Boulis, N., . . . Olanow, C. W. (2013). Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients. *Neurology*, 80(18), 1698-1701. doi:10.1212/WNL.0b013e3182904faa
- Bartus, R. T., Brown, L., Wilson, A., Kruegel, B., Siffert, J., Johnson, E. M., Jr., . . . Herzog, C. D. (2011). Properly scaled and targeted AAV2-NRTN (neurturin) to the substantia nigra is safe, effective and causes no weight loss: support for nigral targeting in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 44(1), 38-52. doi:10.1016/j.nbd.2011.05.026
- Bartus, R. T., Herzog, C. D., Chu, Y., Wilson, A., Brown, L., Siffert, J., . . . Kordower, J. H. (2011). Bioactivity of AAV2-neurturin gene therapy (CERE-120): differences between Parkinson's disease and nonhuman primate brains. *Mov Disord*, 26(1), 27-36. doi:10.1002/mds.23442
- Bartus, R. T., Kordower, J. H., Johnson, E. M., Jr., Brown, L., Kruegel, B. R., Chu, Y., . . . Herzog, C. D. (2015). Post-mortem assessment of the short and long-term effects of the trophic factor neurturin in patients with α -synucleinopathies. *Neurobiol Dis*, 78, 162-171. doi:10.1016/j.nbd.2015.03.023
- Bastiaens, J., Dorfman, B. J., Christos, P. J., & Nirenberg, M. J. (2013). Prospective cohort study of impulse control disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 28(3), 327-333. doi:10.1002/mds.25291
- Baunez, C., Nieoullon, A., & Amalric, M. (1995). In a rat model of parkinsonism, lesions of the subthalamic nucleus reverse increases of reaction time but induce a dramatic premature responding deficit. *J Neurosci*, 15(10), 6531-6541. doi:10.1523/jneurosci.15-10-06531.1995
- Beach, T. G., Adler, C. H., Lue, L., Sue, L. I., Bachalakuri, J., Henry-Watson, J., . . . Walker, D. G. (2009). Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathol*, 117(6), 613-634. doi:10.1007/s00401-009-0538-8
- Bechara, A., Damasio, A. R., Damasio, H., & Anderson, S. W. (1994). Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition*, 50(1-3), 7-15.
- Bechara, A., Damasio, H., & Damasio, A. R. (2000). Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex*, 10(3), 295-307. doi:10.1093/cercor/10.3.295
- Bechara, A., Damasio, H., Tranel, D., & Damasio, A. R. (2005). The Iowa Gambling Task and the somatic marker hypothesis: some questions and answers. *Trends Cogn Sci*, 9(4), 159-162; discussion 162-154. doi:10.1016/j.tics.2005.02.002
- Belaid, H., Adrien, J., Laffrat, E., Tandé, D., Karachi, C., Grabli, D., . . . François, C. (2014). Sleep disorders in Parkinsonian macaques: effects of L-dopa treatment and pedunculopontine nucleus lesion. *J Neurosci*, 34(27), 9124-9133. doi:10.1523/jneurosci.0181-14.2014

- Benabid, A. L., Pollak, P., Louveau, A., Henry, S., & de Rougemont, J. (1987). Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol*, *50*(1-6), 344-346. doi:10.1159/000100803
- Benes, F. M. (2001). Carlsson and the discovery of dopamine. *Trends Pharmacol Sci*, *22*(1), 46-47. doi:10.1016/s0165-6147(00)01607-2
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., & Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci*, *20*(4), 415-455.
- Bertrand, J. A., Bedetti, C., Postuma, R. B., Monchi, O., Génier Marchand, D., Jubault, T., & Gagnon, J. F. (2012). Color discrimination deficits in Parkinson's disease are related to cognitive impairment and white-matter alterations. *Mov Disord*, *27*(14), 1781-1788. doi:10.1002/mds.25272
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, *3*(12), 1301-1306. doi:10.1038/81834
- Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., . . . Gross, C. E. (2001). Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, *21*(17), 6853-6861.
- Bezard, E., Gross, C. E., & Brotchie, J. M. (2003). Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci*, *26*(4), 215-221. doi:10.1016/s0166-2236(03)00038-9
- 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 Res*, *766*(1-2), 107-112. doi:10.1016/s0006-8993(97)00531-3
- Biju, K. C., Santacruz, R. A., Chen, C., Zhou, Q., Yao, J., Rohrabough, S. L., . . . Li, S. (2013). Bone marrow-derived microglia-based neurturin delivery protects against dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, *535*, 24-29. doi:10.1016/j.neulet.2012.12.034
- Bjorklund, A., Bjorklund, T., & Kirik, D. (2009). Gene therapy for dopamine replacement in Parkinson's disease. *Sci Transl Med*, *1*(2), 2ps2. doi:10.1126/scitranslmed.3000350
- Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Vyas, S., Michel, P. P., Javoy-Agid, F., Uhl, G., & Agid, Y. (1994). Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Brain Res Mol Brain Res*, *22*(1-4), 29-38. doi:10.1016/0169-328x(94)90029-9
- Blauwendraat, C., Nalls, M. A., & Singleton, A. B. (2020). The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, *19*(2), 170-178. doi:10.1016/s1474-4422(19)30287-x
- Bornebroek, M., de Lau, L. M., Haag, M. D., Koudstaal, P. J., Hofman, A., Stricker, B. H., & Breteler, M. M. (2007). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Neuroepidemiology*, *28*(4), 193-196. doi:10.1159/000108110
- Boulet, S., Mounayar, S., Poupard, A., Bertrand, A., Jan, C., Pessiglione, M., . . . Tremblay, L. (2008). Behavioral recovery in MPTP-treated monkeys: neurochemical mechanisms studied by intrastriatal microdialysis. *J Neurosci*, *28*(38), 9575-9584. doi:10.1523/jneurosci.3465-08.2008
- Bourdenx, M., Dovero, S., Engeln, M., Bido, S., Bastide, M. F., Dutheil, N., . . . Dehay, B. (2015). Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by alpha-synuclein overexpression. *Acta Neuropathol Commun*, *3*, 46. doi:10.1186/s40478-015-0222-2
- Bourdenx, M., Nioche, A., Dovero, S., Arotcarena, M. L., Camus, S., Porras, G., . . . Bezard, E. (2020). Identification of distinct pathological signatures induced by patient-derived α -synuclein structures in nonhuman primates. *Sci Adv*, *6*(20), eaaz9165. doi:10.1126/sciadv.aaz9165
- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P. H., Habenstein, B., . . . Melki, R. (2013). Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun*, *4*, 2575. doi:10.1038/ncomms3575

- Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D., & Rub, U. (2002). Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol*, *249 Suppl 3*, Iii/1-5.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, *24*(2), 197-211.
- Brooks, W. J., Jarvis, M. F., & Wagner, G. C. (1989). Astrocytes as a primary locus for the conversion MPTP into MPP+. *J Neural Transm*, *76*(1), 1-12.
- Brouillet, E., & Hantraye, P. (1995). Effects of chronic MPTP and 3-nitropropionic acid in nonhuman primates. *Curr Opin Neurol*, *8*(6), 469-473. doi:10.1097/00019052-199512000-00014
- Brown, C. A., Campbell, M. C., Karimi, M., Tabbal, S. D., Loftin, S. K., Tian, L. L., . . . Perlmutter, J. S. (2012). Dopamine pathway loss in nucleus accumbens and ventral tegmental area predicts apathetic behavior in MPTP-lesioned monkeys. *Exp Neurol*, *236*(1), 190-197. doi:10.1016/j.expneurol.2012.04.025
- Brundin, P., Melki, R., & Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(4), 301-307. doi:10.1038/nrm2873
- Bubak, A. N., Redmond, D. E., Jr., Elsworth, J. D., Roth, R. H., Collier, T. J., Bjugstad, K. B., . . . Sladek, J. R., Jr. (2015). A potential compensatory role for endogenous striatal tyrosine hydroxylase-positive neurons in a nonhuman primate model of Parkinson's disease. *Cell Transplant*, *24*(4), 673-680. doi:10.3727/096368915x687741
- Burns, R. S., Chiueh, C. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Jacobowitz, D. M., & Kopin, I. J. (1983). A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *80*(14), 4546-4550.
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Südhof, T. C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, *329*(5999), 1663-1667. doi:10.1126/science.1195227
- Butler, B., Goodwin, S., Saha, K., Becker, J., Sambo, D., Davari, P., & Khoshbouei, H. (2015). Dopamine transporter activity is modulated by α -synuclein. *J Biol Chem*, *290*(31), 19009. doi:10.1074/jbc.A115.639880
- Buttery, P. C., & Barker, R. A. (2020). Gene and Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease: Where Are We? *Neurotherapeutics*. doi:10.1007/s13311-020-00940-4
- Callaghan, R. C., Cunningham, J. K., Sajeev, G., & Kish, S. J. (2010). Incidence of Parkinson's disease among hospital patients with methamphetamine-use disorders. *Mov Disord*, *25*(14), 2333-2339. doi:10.1002/mds.23263
- Carlsson, A., & Waldeck, B. (1958). A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta Physiol Scand*, *44*(3-4), 293-298. doi:10.1111/j.1748-1716.1958.tb01628.x
- Carlsson, T., Winkler, C., Burger, C., Muzyczka, N., Mandel, R. J., Cenci, A., . . . Kirik, D. (2005). Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous L-DOPA delivery using rAAV vectors. *Brain*, *128*(Pt 3), 559-569. doi:10.1093/brain/awh374
- Carlsson, T., Winkler, C., Lundblad, M., Cenci, M. A., Björklund, A., & Kirik, D. (2006). Graft placement and uneven pattern of reinnervation in the striatum is important for development of graft-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis*, *27*(3), 657-668. doi:10.1016/j.nbd.2005.09.008
- Carta, M., Carlsson, T., Muñoz, A., Kirik, D., & Björklund, A. (2010). Role of serotonin neurons in the induction of levodopa- and graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord*, *25 Suppl 1*, S174-179. doi:10.1002/mds.22792
- Cash, R., Dennis, T., L'Heureux, R., Raisman, R., Javoy-Agid, F., & Scatton, B. (1987). Parkinson's disease and dementia: norepinephrine and dopamine in locus ceruleus. *Neurology*, *37*(1), 42-46. doi:10.1212/wnl.37.1.42

- Caslake, R., Summers, F., McConachie, D., Ferris, C., Gordon, J., Harris, C., . . . Counsell, C. (2013). The mini-mental Parkinson's (MMP) as a cognitive screening tool in people with Parkinson's disease. *Curr Aging Sci*, *6*(3), 273-279. doi:10.2174/18746098112059990030
- Catalán, M. J., de Pablo-Fernández, E., Villanueva, C., Fernández-Diez, S., Lapeña-Montero, T., García-Ramos, R., & López-Valdés, E. (2013). Levodopa infusion improves impulsivity and dopamine dysregulation syndrome in Parkinson's disease. *Mov Disord*, *28*(14), 2007-2010. doi:10.1002/mds.25636
- Cederfjall, E., Broom, L., & Kirik, D. (2015). Controlled Striatal DOPA Production From a Gene Delivery System in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *Mol Ther*, *23*(5), 896-906. doi:10.1038/mt.2015.8
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., . . . Destée, A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, *364*(9440), 1167-1169. doi:10.1016/s0140-6736(04)17103-1
- Chau, K. Y., Ching, H. L., Schapira, A. H., & Cooper, J. M. (2009). Relationship between alpha synuclein phosphorylation, proteasomal inhibition and cell death: relevance to Parkinson's disease pathogenesis. *J Neurochem*, *110*(3), 1005-1013. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06191.x
- 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. doi:10.1016/s1474-4422(06)70373-8
- Chen, H., O'Reilly, E., McCullough, M. L., Rodriguez, C., Schwarzschild, M. A., Calle, E. E., . . . Ascherio, A. (2007). Consumption of dairy products and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*, *165*(9), 998-1006. doi:10.1093/aje/kwk089
- Chen, Y. H., Harvey, B. K., Hoffman, A. F., Wang, Y., Chiang, Y. H., & Lupica, C. R. (2008). MPTP-induced deficits in striatal synaptic plasticity are prevented by glial cell line-derived neurotrophic factor expressed via an adeno-associated viral vector. *Faseb j*, *22*(1), 261-275. doi:10.1096/fj.07-8797com
- Chesselet, M. F. (2008). In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp Neurol*, *209*(1), 22-27. doi:10.1016/j.expneurol.2007.08.006
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol*, *37*(5), 942-946. doi:10.1016/j.biocel.2004.09.009
- Chong, T. T., Bonnelle, V., Manohar, S., Veromann, K. R., Muhammed, K., Tofaris, G. K., . . . Husain, M. (2015). Dopamine enhances willingness to exert effort for reward in Parkinson's disease. *Cortex*, *69*, 40-46. doi:10.1016/j.cortex.2015.04.003
- Chong, T. T., Bonnelle, V., Veromann, K. R., Juurmaa, J., Taba, P., Plant, O., & Husain, M. (2018). Dissociation of reward and effort sensitivity in methcathinone-induced Parkinsonism. *J Neuropsychol*, *12*(2), 291-297. doi:10.1111/jnp.12122
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0202770
- Christine, C. W., Bankiewicz, K. S., Van Laar, A. D., Richardson, R. M., Ravina, B., Kells, A. P., . . . Larson, P. S. (2019). Magnetic resonance imaging-guided phase 1 trial of putaminal AADC gene therapy for Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *85*(5), 704-714. doi:10.1002/ana.25450
- Christine, C. W., Starr, P. A., Larson, P. S., Eberling, J. L., Jagust, W. J., Hawkins, R. A., . . . Aminoff, M. J. (2009). Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*, *73*(20), 1662-1669. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c29356
- Chu, Y., Bartus, R. T., Manfredsson, F. P., Olanow, C. W., & Kordower, J. H. (2020). Long-term post-mortem studies following neurturin gene therapy in patients with advanced Parkinson's disease. *Brain*, *143*(3), 960-975. doi:10.1093/brain/awaa020
- Chu, Y., Muller, S., Tavares, A., Barret, O., Alagille, D., Seibyl, J., . . . Kordower, J. H. (2019). Intrastratial alpha-synuclein fibrils in monkeys: spreading, imaging and neuropathological changes. *Brain*. doi:10.1093/brain/awz296

- Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci*, *21*(6), 249-254. doi:10.1016/s0166-2236(97)01213-7
- Collier, T. J., & Sortwell, C. E. (1999). Therapeutic potential of nerve growth factors in Parkinson's disease. *Drugs Aging*, *14*(4), 261-287. doi:10.2165/00002512-199914040-00003
- Cools, R. (2006). Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*, *30*(1), 1-23. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.024
- Cools, R., Barker, R. A., Sahakian, B. J., & Robbins, T. W. (2003). L-Dopa medication remediates cognitive inflexibility, but increases impulsivity in patients with Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, *41*(11), 1431-1441.
- Corti, O., Lesage, S., & Brice, A. (2011). What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev*, *91*(4), 1161-1218. doi:10.1152/physrev.00022.2010
- Corti, O., Sánchez-Capelo, A., Colin, P., Hanoun, N., Hamon, M., & Mallet, J. (1999). Long-term doxycycline-controlled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(21), 12120-12125. doi:10.1073/pnas.96.21.12120
- Corvol, J. C., Artaud, F., Cormier-Dequaire, F., Rascol, O., Durif, F., Derkinderen, P., . . . Elbaz, A. (2018). Longitudinal analysis of impulse control disorders in Parkinson disease. *Neurology*, *91*(3), e189-e201. doi:10.1212/wnl.0000000000005816
- Costello, S., Cockburn, M., Bronstein, J., Zhang, X., & Ritz, B. (2009). Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol*, *169*(8), 919-926. doi:10.1093/aje/kwp006
- Cuenca, N., Herrero, M. T., Angulo, A., de Juan, E., Martínez-Navarrete, G. C., Lopez, S., . . . Martín-Nieto, J. (2005). Morphological impairments in retinal neurons of the scotopic visual pathway in a monkey model of Parkinson's disease. *J Comp Neurol*, *493*(2), 261-273. doi:10.1002/cne.20761
- Dave, K. D., De Silva, S., Sheth, N. P., Ramboz, S., Beck, M. J., Quang, C., . . . Frasier, M. A. (2014). Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, *70*, 190-203. doi:10.1016/j.nbd.2014.06.009
- Decamp, E., & Schneider, J. S. (2004). Attention and executive function deficits in chronic low-dose MPTP-treated non-human primates. *Eur J Neurosci*, *20*(5), 1371-1378. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03586.x
- Decamp, E., & Schneider, J. S. (2006). Effects of nicotinic therapies on attention and executive functions in chronic low-dose MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci*, *24*(7), 2098-2104. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05077.x
- Decressac, M., Kadkhodaei, B., Mattsson, B., Laguna, A., Perlmann, T., & Björklund, A. (2012). α -Synuclein-induced down-regulation of Nurr1 disrupts GDNF signaling in nigral dopamine neurons. *Sci Transl Med*, *4*(163), 163ra156. doi:10.1126/scitranslmed.3004676
- 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. *Neurobiol Dis*, *45*(3), 939-953. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.013
- Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., . . . Meissner, W. G. (2015). Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol*, *14*(8), 855-866. doi:10.1016/s1474-4422(15)00006-x
- DeLong, M. R., & Wichmann, T. (2015). Basal Ganglia Circuits as Targets for Neuromodulation in Parkinson Disease. *JAMA Neurol*, *72*(11), 1354-1360. doi:10.1001/jamaneurol.2015.2397
- Dissanayaka, N. N., Sellbach, A., Matheson, S., O'Sullivan, J. D., Silburn, P. A., Byrne, G. J., . . . Mellick, G. D. (2010). Anxiety disorders in Parkinson's disease: prevalence and risk factors. *Mov Disord*, *25*(7), 838-845. doi:10.1002/mds.22833

- Djamshidian, A., Cardoso, F., Grosset, D., Bowden-Jones, H., & Lees, A. J. (2011). Pathological gambling in Parkinson's disease--a review of the literature. *Mov Disord*, *26*(11), 1976-1984. doi:10.1002/mds.23821
- Djelloul, M., Holmqvist, S., Boza-Serrano, A., Azevedo, C., Yeung, M. S., Goldwurm, S., . . . Roybon, L. (2015). Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Lineage: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models. *Stem Cell Reports*, *5*(2), 174-184. doi:10.1016/j.stemcr.2015.07.002
- Doty, R. L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*, *8*(6), 329-339. doi:10.1038/nrneurol.2012.80
- Dujardin, K., Sockeel, P., Delliaux, M., Destée, A., & Defebvre, L. (2009). Apathy may herald cognitive decline and dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord*, *24*(16), 2391-2397. doi:10.1002/mds.22843
- During, M. J., Samulski, R. J., Elsworth, J. D., Kaplitt, M. G., Leone, P., Xiao, X., . . . Redmond, D. E., Jr. (1998). In vivo expression of therapeutic human genes for dopamine production in the caudates of MPTP-treated monkeys using an AAV vector. *Gene Ther*, *5*(6), 820-827. doi:10.1038/sj.gt.3300650
- Earls, R. H., Menees, K. B., Chung, J., Barber, J., Gutekunst, C. A., Hazim, M. G., & Lee, J. K. (2019). Intrastratial injection of preformed alpha-synuclein fibrils alters central and peripheral immune cell profiles in non-transgenic mice. *J Neuroinflammation*, *16*(1), 250. doi:10.1186/s12974-019-1636-8
- Eberling, J. L., Jagust, W. J., Christine, C. W., Starr, P., Larson, P., Bankiewicz, K. S., & Aminoff, M. J. (2008). Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*, *70*(21), 1980-1983. doi:10.1212/01.wnl.0000312381.29287.ff
- Eberling, J. L., Kells, A. P., Pivrotto, P., Beyer, J., Bringas, J., Federoff, H. J., . . . Bankiewicz, K. S. (2009). Functional effects of AAV2-GDNF on the dopaminergic nigrostriatal pathway in parkinsonian rhesus monkeys. *Hum Gene Ther*, *20*(5), 511-518. doi:10.1089/hum.2008.201
- Eidelberg, E., Brooks, B. A., Morgan, W. W., Walden, J. G., & Kokemoor, R. H. (1986). Variability and functional recovery in the N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of parkinsonism in monkeys. *Neuroscience*, *18*(4), 817-822.
- Elsworth, J. D., Taylor, J. R., Sladek, J. R., Jr., Collier, T. J., Redmond, D. E., Jr., & Roth, R. H. (2000). Striatal dopaminergic correlates of stable parkinsonism and degree of recovery in old-world primates one year after MPTP treatment. *Neuroscience*, *95*(2), 399-408.
- Emborg, M. E., Carbon, M., Holden, J. E., During, M. J., Ma, Y., Tang, C., . . . Eidelberg, D. (2007). Subthalamic glutamic acid decarboxylase gene therapy: changes in motor function and cortical metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab*, *27*(3), 501-509. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600364
- Emborg, M. E., Liu, Y., Xi, J., Zhang, X., Yin, Y., Lu, J., . . . Zhang, S. C. (2013). Induced pluripotent stem cell-derived neural cells survive and mature in the nonhuman primate brain. *Cell Rep*, *3*(3), 646-650. doi:10.1016/j.celrep.2013.02.016
- Eslamboli, A., Romero-Ramos, M., Burger, C., Bjorklund, T., Muzyczka, N., Mandel, R. J., . . . Kirik, D. (2007). Long-term consequences of human alpha-synuclein overexpression in the primate ventral midbrain. *Brain*, *130*(Pt 3), 799-815. doi:10.1093/brain/awl382
- Espadas-Alvarez, A. J., Bannon, M. J., Orozco-Barrios, C. E., Escobedo-Sanchez, L., Ayala-Davila, J., Reyes-Corona, D., . . . Martinez-Fong, D. (2017). Regulation of human GDNF gene expression in nigral dopaminergic neurons using a new doxycycline-regulated NTS-polyplex nanoparticle system. *Nanomedicine*, *13*(4), 1363-1375. doi:10.1016/j.nano.2017.02.006
- Esteves, M., Moreira, P. S., Sousa, N., & Leite-Almeida, H. (2021). Assessing Impulsivity in Humans and Rodents: Taking the Translational Road. *Front Behav Neurosci*, *15*, 647922. doi:10.3389/fnbeh.2021.647922
- Evens, R., Hoefler, M., Biber, K., & Lueken, U. (2016). The Iowa Gambling Task in Parkinson's disease: A meta-analysis on effects of disease and medication. *Neuropsychologia*, *91*, 163-172. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2016.07.032

- Fasano, A., Daniele, A., & Albanese, A. (2012). Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation. *Lancet Neurol*, *11*(5), 429-442. doi:10.1016/s1474-4422(12)70049-2
- Feigin, A., Kaplitt, M. G., Tang, C., Lin, T., Mattis, P., Dhawan, V., . . . Eidelberg, D. (2007). Modulation of metabolic brain networks after subthalamic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(49), 19559-19564. doi:10.1073/pnas.0706006104
- Fenyi, A., Duyckaerts, C., Bousset, L., Braak, H., Del Tredici, K., Melki, R., & On Behalf Of The Brainbank Neuro-Ceb Neuropathology, N. (2021). Seeding Propensity and Characteristics of Pathogenic α Syn Assemblies in Formalin-Fixed Human Tissue from the Enteric Nervous System, Olfactory Bulb, and Brainstem in Cases Staged for Parkinson's Disease. *Cells*, *10*(1). doi:10.3390/cells10010139
- Fernandez-Ruiz, J., Doudet, D. J., & Aigner, T. G. (1995). Long-term cognitive impairment in MPTP-treated rhesus monkeys. *Neuroreport*, *7*(1), 102-104.
- Fields, C. R., Bengoa-Vergniory, N., & Wade-Martins, R. (2019). Targeting Alpha-Synuclein as a Therapy for Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci*, *12*, 299. doi:10.3389/fnmol.2019.00299
- Fifel, K., Vezoli, J., Dzahini, K., Claustrat, B., Leviel, V., Kennedy, H., . . . Cooper, H. M. (2014). Alteration of daily and circadian rhythms following dopamine depletion in MPTP treated non-human primates. *PLoS One*, *9*(1), e86240. doi:10.1371/journal.pone.0086240
- Follett, K. A., Weaver, F. M., Stern, M., Hur, K., Harris, C. L., Luo, P., . . . Reda, D. J. (2010). Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*, *362*(22), 2077-2091. doi:10.1056/NEJMoa0907083
- Forno, L. S., DeLanney, L. E., Irwin, I., & Langston, J. W. (1993). Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol*, *60*, 600-608.
- Forsayeth, J. R., Eberling, J. L., Sanftner, L. M., Zhen, Z., Pivrotto, P., Bringas, J., . . . Bankiewicz, K. S. (2006). A dose-ranging study of AAV-hAADC therapy in Parkinsonian monkeys. *Mol Ther*, *14*(4), 571-577. doi:10.1016/j.ymthe.2006.04.008
- Fox, S. H., Visanji, N., Reyes, G., Huot, P., Gomez-Ramirez, J., Johnston, T., & Brotchie, J. M. (2010). Neuropsychiatric behaviors in the MPTP marmoset model of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*, *37*(1), 86-95. doi:10.1017/s0317167100009707
- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W. Y., DuMouchel, W., Kao, R., . . . Fahn, S. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*, *344*(10), 710-719. doi:10.1056/nejm200103083441002
- Gash, D. M., Rutland, K., Hudson, N. L., Sullivan, P. G., Bing, G., Cass, W. A., . . . Prince, T. S. (2008). Trichloroethylene: Parkinsonism and complex 1 mitochondrial neurotoxicity. *Ann Neurol*, *63*(2), 184-192. doi:10.1002/ana.21288
- Gasmi, M., Brandon, E. P., Herzog, C. D., Wilson, A., Bishop, K. M., Hofer, E. K., . . . Bartus, R. T. (2007). AAV2-mediated delivery of human neurturin to the rat nigrostriatal system: long-term efficacy and tolerability of CERE-120 for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, *27*(1), 67-76. doi:10.1016/j.nbd.2007.04.003
- Gasmi, M., Herzog, C. D., Brandon, E. P., Cunningham, J. J., Ramirez, G. A., Ketchum, E. T., & Bartus, R. T. (2007). Striatal delivery of neurturin by CERE-120, an AAV2 vector for the treatment of dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease. *Mol Ther*, *15*(1), 62-68. doi:10.1038/sj.mt.6300010
- Georgievska, B., Jakobsson, J., Persson, E., Ericson, C., Kirik, D., & Lundberg, C. (2004). Regulated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor into rat striatum, using a tetracycline-dependent lentiviral vector. *Hum Gene Ther*, *15*(10), 934-944. doi:10.1089/hum.2004.15.934
- Ghilardi, M. F., Chung, E., Bodis-Wollner, I., Dvorzaniak, M., Glover, A., & Onofrj, M. (1988). Systemic 1-methyl,4-phenyl,1-2-3-6-tetrahydropyridine (MPTP) administration decreases retinal dopamine content in primates. *Life Sci*, *43*(3), 255-262. doi:10.1016/0024-3205(88)90315-3

- Giasson, B. I., Murray, I. V., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem*, *276*(4), 2380-2386. doi:10.1074/jbc.M008919200
- Gibb, J. W., Johnson, M., & Hanson, G. R. (1990). Neurochemical basis of neurotoxicity. *Neurotoxicology*, *11*(2), 317-321.
- Gill, S. S., Patel, N. K., Hotton, G. R., O'Sullivan, K., McCarter, R., Bunnage, M., . . . Heywood, P. (2003). Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med*, *9*(5), 589-595. doi:10.1038/nm850
- Gispert, S., Ricciardi, F., Kurz, A., Azizov, M., Hoepken, H. H., Becker, D., . . . Auburger, G. (2009). Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS One*, *4*(6), e5777. doi:10.1371/journal.pone.0005777
- Glasl, L., Kloos, K., Giesert, F., Roethig, A., Di Benedetto, B., Kühn, R., . . . Wurst, W. (2012). Pink1-deficiency in mice impairs gait, olfaction and serotonergic innervation of the olfactory bulb. *Exp Neurol*, *235*(1), 214-227. doi:10.1016/j.expneurol.2012.01.002
- Goetz, C. G. (2011). The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *1*(1), a008862. doi:10.1101/cshperspect.a008862
- Goetz, C. G., Stebbins, G. T., 3rd, Klawans, H. L., Koller, W. C., Grossman, R. G., Bakay, R. A., & Penn, R. D. (1991). United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants: presurgical, and 1- and 2-year follow-up. *Neurology*, *41*(11), 1719-1722. doi:10.1212/wnl.41.11.1719
- Goldberg, M. S., Pisani, A., Haburcak, M., Vortherms, T. A., Kitada, T., Costa, C., . . . Shen, J. (2005). Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron*, *45*(4), 489-496. doi:10.1016/j.neuron.2005.01.041
- Goldenberg, M. M. (2008). Medical management of Parkinson's disease. *P t*, *33*(10), 590-606.
- Goldman, J. G., Vernaleo, B. A., Camicioli, R., Dahodwala, N., Dobkin, R. D., Ellis, T., . . . Simmonds, D. (2018). Cognitive impairment in Parkinson's disease: a report from a multidisciplinary symposium on unmet needs and future directions to maintain cognitive health. *NPJ Parkinsons Dis*, *4*, 19. doi:10.1038/s41531-018-0055-3
- Gómez-Benito, M., Granado, N., García-Sanz, P., Michel, A., Dumoulin, M., & Moratalla, R. (2020). Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. *Front Pharmacol*, *11*, 356. doi:10.3389/fphar.2020.00356
- González-Hernández, T., Barroso-Chinea, P., De La Cruz Muros, I., Del Mar Pérez-Delgado, M., & Rodríguez, M. (2004). Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. *J Comp Neurol*, *479*(2), 198-215. doi:10.1002/cne.20323
- Gracia, P., Camino, J. D., Volpicelli-Daley, L., & Cremades, N. (2020). Multiplicity of α -Synuclein Aggregated Species and Their Possible Roles in Disease. *Int J Mol Sci*, *21*(21). doi:10.3390/ijms21218043
- Gray, R., Ives, N., Rick, C., Patel, S., Gray, A., Jenkinson, C., . . . Clarke, C. E. (2014). Long-term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for Parkinson's disease (PD MED): a large, open-label, pragmatic randomised trial. *Lancet*, *384*(9949), 1196-1205. doi:10.1016/s0140-6736(14)60683-8
- Greenfield, J. G., & Bosanquet, F. D. (1953). The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *16*(4), 213-226. doi:10.1136/jnnp.16.4.213
- Gros, P., & Videnovic, A. (2017). SLEEP AND CIRCADIAN RHYTHM DISORDERS IN PARKINSON'S DISEASE. *Curr Sleep Med Rep*, *3*(3), 222-234. doi:10.1007/s40675-017-0079-y
- Gross, R. E., Watts, R. L., Hauser, R. A., Bakay, R. A., Reichmann, H., von Kummer, R., . . . Sandbrink, R. (2011). Intra-striatal transplantation of microcarrier-bound human retinal pigment epithelial cells versus sham surgery in patients with advanced Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol*, *10*(6), 509-519. doi:10.1016/s1474-4422(11)70097-7

- Guigoni, C., Dovero, S., Aubert, I., Li, Q., Bioulac, B. H., Bloch, B., . . . Bezdard, E. (2005). Levodopa-induced dyskinesia in MPTP-treated macaques is not dependent on the extent and pattern of nigrostriatal lesioning. *Eur J Neurosci*, *22*(1), 283-287. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04196.x
- Guo, J. L., Covell, D. J., Daniels, J. P., Iba, M., Stieber, A., Zhang, B., . . . Lee, V. M. (2013). Distinct α -synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell*, *154*(1), 103-117. doi:10.1016/j.cell.2013.05.057
- Gupta, K. (2002). Addressing antibiotic resistance. *Am J Med*, *113 Suppl 1A*, 29s-34s. doi:10.1016/s0002-9343(02)01057-4
- Gupta, M., Felten, D. L., & Gash, D. M. (1984). MPTP alters central catecholamine neurons in addition to the nigrostriatal system. *Brain Res Bull*, *13*(6), 737-742. doi:10.1016/0361-9230(84)90234-x
- Hadaczek, P., Eberling, J. L., Pivrotto, P., Bringas, J., Forsayeth, J., & Bankiewicz, K. S. (2010). Eight years of clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV2-hAADC. *Mol Ther*, *18*(8), 1458-1461. doi:10.1038/mt.2010.106
- Halliday, G., Herrero, M. T., Murphy, K., McCann, H., Ros-Bernal, F., Barcia, C., . . . Obeso, J. A. (2009). No Lewy pathology in monkeys with over 10 years of severe MPTP Parkinsonism. *Mov Disord*, *24*(10), 1519-1523. doi:10.1002/mds.22481
- Halliday, G. M., Blumbergs, P. C., Cotton, R. G., Blessing, W. W., & Geffen, L. B. (1990). Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res*, *510*(1), 104-107. doi:10.1016/0006-8993(90)90733-r
- Hämmerer, D., & Eppinger, B. (2012). Dopaminergic and prefrontal contributions to reward-based learning and outcome monitoring during child development and aging. *Dev Psychol*, *48*(3), 862-874. doi:10.1037/a0027342
- Hansen, C., Björklund, T., Petit, G. H., Lundblad, M., Murmu, R. P., Brundin, P., & Li, J. Y. (2013). A novel α -synuclein-GFP mouse model displays progressive motor impairment, olfactory dysfunction and accumulation of α -synuclein-GFP. *Neurobiol Dis*, *56*, 145-155. doi:10.1016/j.nbd.2013.04.017
- Hantraye, P., Varastet, M., Peschanski, M., Riche, D., Cesaro, P., Willer, J. C., & Maziere, M. (1993). Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. *Neuroscience*, *53*(1), 169-178.
- Harms, A. S., Delic, V., Thome, A. D., Bryant, N., Liu, Z., Chandra, S., . . . West, A. B. (2017). α -Synuclein fibrils recruit peripheral immune cells in the rat brain prior to neurodegeneration. *Acta Neuropathol Commun*, *5*(1), 85. doi:10.1186/s40478-017-0494-9
- Hasegawa, M., Fujiwara, H., Nonaka, T., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Lee, V. M., . . . Iwatsubo, T. (2002). Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem*, *277*(50), 49071-49076. doi:10.1074/jbc.M208046200
- Hauser, R. A., Hsu, A., Kell, S., Espay, A. J., Sethi, K., Stacy, M., . . . Gupta, S. (2013). Extended-release carbidopa-levodopa (IPX066) compared with immediate-release carbidopa-levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations: a phase 3 randomised, double-blind trial. *Lancet Neurol*, *12*(4), 346-356. doi:10.1016/s1474-4422(13)70025-5
- Heiss, J. D., Lungu, C., Hammoud, D. A., Herscovitch, P., Ehrlich, D. J., Argersinger, D. P., . . . Bankiewicz, K. S. (2019). Trial of magnetic resonance-guided putaminal gene therapy for advanced Parkinson's disease. *Mov Disord*. doi:10.1002/mds.27724
- Herzog, C. D., Brown, L., Gammon, D., Kruegel, B., Lin, R., Wilson, A., . . . Bartus, R. T. (2009). Expression, bioactivity, and safety 1 year after adeno-associated viral vector type 2-mediated delivery of neurturin to the monkey nigrostriatal system support cere-120 for Parkinson's disease. *Neurosurgery*, *64*(4), 602-612; discussion 612-603. doi:10.1227/01.neu.0000340682.06068.01
- Herzog, C. D., Brown, L., Kruegel, B. R., Wilson, A., Tansey, M. G., Gage, F. H., . . . Bartus, R. T. (2013). Enhanced neurotrophic distribution, cell signaling and neuroprotection following substantia nigral versus striatal delivery of AAV2-NRTN (CERE-120). *Neurobiol Dis*, *58*, 38-48. doi:10.1016/j.nbd.2013.04.011

- Herzog, C. D., Dass, B., Gasmi, M., Bakay, R., Stansell, J. E., Tuszynski, M., . . . Bartus, R. T. (2008). Transgene expression, bioactivity, and safety of CER-120 (AAV2-neurturin) following delivery to the monkey striatum. *Mol Ther*, *16*(10), 1737-1744. doi:10.1038/mt.2008.170
- Herzog, C. D., Dass, B., Holden, J. E., Stansell, J., 3rd, Gasmi, M., Tuszynski, M. H., . . . Kordower, J. H. (2007). Striatal delivery of CER-120, an AAV2 vector encoding human neurturin, enhances activity of the dopaminergic nigrostriatal system in aged monkeys. *Mov Disord*, *22*(8), 1124-1132. doi:10.1002/mds.21503
- Hinkle, K. M., Yue, M., Behrouz, B., Dächsel, J. C., Lincoln, S. J., Bowles, E. E., . . . Melrose, H. L. (2012). LRRK2 knockout mice have an intact dopaminergic system but display alterations in exploratory and motor co-ordination behaviors. *Mol Neurodegener*, *7*, 25. doi:10.1186/1750-1326-7-25
- Huang, B., Wu, S., Wang, Z., Ge, L., Rizak, J. D., Wu, J., . . . Li, H. (2018). Phosphorylated α -Synuclein Accumulations and Lewy Body-like Pathology Distributed in Parkinson's Disease-Related Brain Areas of Aged Rhesus Monkeys Treated with MPTP. *Neuroscience*, *379*, 302-315. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.03.026
- Ibáñez, P., Bonnet, A. M., Débarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., . . . Brice, A. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*, *364*(9440), 1169-1171. doi:10.1016/s0140-6736(04)17104-3
- Ikeda, M., Kawarabayashi, T., Harigaya, Y., Sasaki, A., Yamada, S., Matsubara, E., . . . Shoji, M. (2009). Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human alpha-synuclein A30P+A53T transgenic mice with alpha-synuclein pathology. *Brain Res*, *1250*, 232-241. doi:10.1016/j.brainres.2008.10.011
- Imbesi, M., Yildiz, S., Dirim Arslan, A., Sharma, R., Manev, H., & Uz, T. (2009). Dopamine receptor-mediated regulation of neuronal "clock" gene expression. *Neuroscience*, *158*(2), 537-544. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.10.044
- Ip, C. W., Klaus, L. C., Karikari, A. A., Visanji, N. P., Brotchie, J. M., Lang, A. E., . . . Koprach, J. B. (2017). AAV1/2-induced overexpression of A53T- α -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 Neuropathol Commun*, *5*(1), 11. doi:10.1186/s40478-017-0416-x
- Iranzo, A. (2011). Sleep-wake changes in the premotor stage of Parkinson disease. *J Neurol Sci*, *310*(1-2), 283-285. doi:10.1016/j.jns.2011.07.049
- Iranzo, A. (2013). Parkinson disease and sleep: sleep-wake changes in the premotor stage of Parkinson disease; impaired olfaction and other prodromal features. *Curr Neurol Neurosci Rep*, *13*(9), 373. doi:10.1007/s11910-013-0373-0
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H. A., . . . Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*, *14*(2), 467-475. doi:10.1016/0896-6273(95)90302-x
- Iwamoto, M., Bjorklund, T., Lundberg, C., Kirik, D., & Wandless, T. J. (2010). A general chemical method to regulate protein stability in the mammalian central nervous system. *Chem Biol*, *17*(9), 981-988. doi:10.1016/j.chembiol.2010.07.009
- Jacobowitz, D. M., Burns, R. S., Chiueh, C. C., & Kopin, I. J. (1984). N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) causes destruction of the nigrostriatal but not the mesolimbic dopamine system in the monkey. *Psychopharmacol Bull*, *20*(3), 416-422.
- Jakes, R., Spillantini, M. G., & Goedert, M. (1994). Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett*, *345*(1), 27-32. doi:10.1016/0014-5793(94)00395-5
- Jan, C., Pessiglione, M., Tremblay, L., Tande, D., Hirsch, E. C., & Francois, C. (2003). Quantitative analysis of dopaminergic loss in relation to functional territories in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci*, *18*(7), 2082-2086.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *79*(4), 368-376. doi:10.1136/jnnp.2007.131045

- Jankovic, J., & Aguilar, L. G. (2008). Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 4(4), 743-757. doi:10.2147/ndt.s2006
- Jarraya, B., Boulet, S., Ralph, G. S., Jan, C., Bonvento, G., Azzouz, M., . . . Palfi, S. (2009). Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Sci Transl Med*, 1(2), 2ra4. doi:10.1126/scitranslmed.3000130
- Jellinger, K. A. (2019). Is Braak staging valid for all types of Parkinson's disease? *J Neural Transm (Vienna)*, 126(4), 423-431. doi:10.1007/s00702-018-1898-9
- Jenner, P., Rupniak, N. M., Rose, S., Kelly, E., Kilpatrick, G., Lees, A., & Marsden, C. D. (1984). 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci Lett*, 50(1-3), 85-90. doi:10.1016/0304-3940(84)90467-1
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet*, 386(9996), 896-912. doi:10.1016/s0140-6736(14)61393-3
- Kalia, S. K., Sankar, T., & Lozano, A. M. (2013). Deep brain stimulation for Parkinson's disease and other movement disorders. *Curr Opin Neurol*, 26(4), 374-380. doi:10.1097/WCO.0b013e3283632d08
- Kambey, P. A., Kanwore, K., Ayanlaja, A. A., Nadeem, I., Du, Y., Buberwa, W., . . . Gao, D. (2021). Failure of Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) in Clinical Trials Orchestrated By Reduced NR4A2 (NURR1) Transcription Factor in Parkinson's Disease. A Systematic Review. *Front Aging Neurosci*, 13, 645583. doi:10.3389/fnagi.2021.645583
- Kaplitt, M. G., Feigin, A., Tang, C., Fitzsimons, H. L., Mattis, P., Lawlor, P. A., . . . During, 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*, 369(9579), 2097-2105. doi:10.1016/s0140-6736(07)60982-9
- Kaplitt, M. G., Leone, P., Samulski, R. J., Xiao, X., Pfaff, D. W., O'Malley, K. L., & During, M. J. (1994). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet*, 8(2), 148-154. doi:10.1038/ng1094-148
- Karampetsou, M., Ardah, M. T., Semitekolou, M., Polissidis, A., Samiotaki, M., Kalomoiri, M., . . . Vekrellis, K. (2017). Phosphorylated exogenous alpha-synuclein fibrils exacerbate pathology and induce neuronal dysfunction in mice. *Sci Rep*, 7(1), 16533. doi:10.1038/s41598-017-15813-8
- Kells, A. P., Eberling, J., Su, X., Pivrotto, P., Bringas, J., Hadaczek, P., . . . Bankiewicz, K. S. (2010). Regeneration of the MPTP-lesioned dopaminergic system after convection-enhanced delivery of AAV2-GDNF. *J Neurosci*, 30(28), 9567-9577. doi:10.1523/jneurosci.0942-10.2010
- Khodr, C. E., Becerra, A., Han, Y., & Bohn, M. C. (2014). Targeting alpha-synuclein with a microRNA-embedded silencing vector in the rat substantia nigra: positive and negative effects. *Brain Res*, 1550, 47-60. doi:10.1016/j.brainres.2014.01.010
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Magotani, H., Onoe, H., Hayashi, T., . . . Takahashi, J. (2017). Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature*, 548(7669), 592-596. doi:10.1038/nature23664
- Kim, R. H., Smith, P. D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M. P., Pownall, S., . . . Mak, T. W. (2005). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(14), 5215-5220. doi:10.1073/pnas.0501282102
- Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., & Date, I. (2019). Animal Models for Parkinson's Disease Research: Trends in the 2000s. *Int J Mol Sci*, 20(21). doi:10.3390/ijms20215402
- Kirik, D., Annett, L. E., Burger, C., Muzyczka, N., Mandel, R. J., & Bjorklund, A. (2003). Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(5), 2884-2889. doi:10.1073/pnas.0536383100
- Kirik, D., Cederfjall, E., Halliday, G., & Petersen, A. (2017). Gene therapy for Parkinson's disease: Disease modification by GDNF family of ligands. *Neurobiol Dis*, 97(Pt B), 179-188. doi:10.1016/j.nbd.2016.09.008

- Kirik, D., Rosenblad, C., Burger, C., Lundberg, C., Johansen, T. E., Muzyczka, N., . . . Bjorklund, A. (2002). Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci*, *22*(7), 2780-2791. doi:20026246
- Kish, S. J. (2003). Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Adv Neurol*, *91*, 39-49.
- Kish, S. J., Shannak, K., & Hornykiewicz, O. (1988). Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med*, *318*(14), 876-880. doi:10.1056/nejm198804073181402
- Kish, S. J., Tong, J., Hornykiewicz, O., Rajput, A., Chang, L. J., Guttman, M., & Furukawa, Y. (2008). Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain*, *131*(Pt 1), 120-131. doi:10.1093/brain/awm239
- Kleiner, A. F. R., Pagnussat, A. S., Prisco, G. D., Vagnini, A., Stocchi, F., De Pandis, M. F., & Galli, M. (2018). Analyzing gait variability and dual-task interference in patients with Parkinson's disease and freezing by means of the word-color Stroop test. *Aging Clin Exp Res*, *30*(9), 1137-1142. doi:10.1007/s40520-017-0862-0
- Ko, W. K. D., Camus, S. M., Li, Q., Yang, J., McGuire, S., Pioli, E. Y., & Bezard, E. (2016). An evaluation of istradefylline treatment on Parkinsonian motor and cognitive deficits in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated macaque models. *Neuropharmacology*, *110*(Pt A), 48-58. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.07.012
- Koprach, J. B., Johnston, T. H., Reyes, G., Omana, V., & Brotchie, J. M. (2016). Towards a Non-Human Primate Model of Alpha-Synucleinopathy for Development of Therapeutics for Parkinson's Disease: Optimization of AAV1/2 Delivery Parameters to Drive Sustained Expression of Alpha Synuclein and Dopaminergic Degeneration in Macaque. *PLoS One*, *11*(11), e0167235. doi:10.1371/journal.pone.0167235
- Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., & Olanow, C. W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med*, *14*(5), 504-506. doi:10.1038/nm1747
- Kordower, J. H., Emborg, M. E., Bloch, J., Ma, S. Y., Chu, Y., Leventhal, L., . . . Aebischer, P. (2000). Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, *290*(5492), 767-773.
- Kordower, J. H., Herzog, C. D., Dass, B., Bakay, R. A., Stansell, J., 3rd, Gasmi, M., & Bartus, R. T. (2006). Delivery of neurturin by AAV2 (CERE-120)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol*, *60*(6), 706-715. doi:10.1002/ana.21032
- Kowall, N. W., Hantraye, P., Brouillet, E., Beal, M. F., McKee, A. C., & Ferrante, R. J. (2000). MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport*, *11*(1), 211-213. doi:10.1097/00001756-200001170-00041
- Krayenbuhl, H., & Yasargil, M. G. (1960). Bilateral thalamotomy in parkinsonism. *J Nerv Ment Dis*, *130*, 538-541. doi:10.1097/00005053-196006000-00013
- Kuo, Y. M., Li, Z., Jiao, Y., Gaborit, N., Pani, A. K., Orrison, B. M., . . . Nussbaum, R. L. (2010). Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated alpha-synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum Mol Genet*, *19*(9), 1633-1650. doi:10.1093/hmg/ddq038
- Kurlan, R., Kim, M. H., & Gash, D. M. (1991). Oral levodopa dose-response study in MPTP-induced hemiparkinsonian monkeys: assessment with a new rating scale for monkey parkinsonism. *Mov Disord*, *6*(2), 111-118. doi:10.1002/mds.870060205
- Kurtis, M. M., Rajah, T., Delgado, L. F., & Dafsari, H. S. (2017). The effect of deep brain stimulation on the non-motor symptoms of Parkinson's disease: a critical review of the current evidence. *NPJ Parkinsons Dis*, *3*, 16024. doi:10.1038/npjparkd.2016.24
- Lam, H. A., Wu, N., Cely, I., Kelly, R. L., Hean, S., Richter, F., . . . Maidment, N. T. (2011). Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity

- precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human α -synuclein. *J Neurosci Res*, 89(7), 1091-1102. doi:10.1002/jnr.22611
- Lang, A. E., Gill, S., Patel, N. K., Lozano, A., Nutt, J. G., Penn, R., . . . Traub, M. (2006). Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol*, 59(3), 459-466. doi:10.1002/ana.20737
- Langston, J. W. (1990). Predicting Parkinson's disease. *Neurology*, 40(10 Suppl 3), suppl 70-74; discussion 75-76.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979-980.
- Langston, J. W., Langston, E. B., & Irwin, I. (1984). MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl*, 100, 49-54.
- Lauwers, E., Debyser, Z., Van Dorpe, J., De Strooper, B., Nuttin, B., & Baekelandt, V. (2003). Neuropathology and neurodegeneration in rodent brain induced by lentiviral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein. *Brain Pathol*, 13(3), 364-372.
- Lavoie, B., & Parent, A. (1991). Dopaminergic neurons expressing calbindin in normal and parkinsonian monkeys. *Neuroreport*, 2(10), 601-604. doi:10.1097/00001756-199110000-00012
- Lee, F. J., Liu, F., Pristupa, Z. B., & Niznik, H. B. (2001). Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *Faseb j*, 15(6), 916-926. doi:10.1096/fj.00-0334com
- Lee, H. J., Kang, S. J., Lee, K., & Im, H. (2011). Human α -synuclein modulates vesicle trafficking through its interaction with prenylated Rab acceptor protein 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 412(4), 526-531. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.028
- Lee, W. Y., Lee, E. A., Jeon, M. Y., Kang, H. Y., & Park, Y. G. (2006). Vesicular monoamine transporter-2 and aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy prevents development of motor complications in parkinsonian rats after chronic intermittent L-3,4-dihydroxyphenylalanine administration. *Exp Neurol*, 197(1), 215-224. doi:10.1016/j.expneurol.2005.09.012
- Levy, R., & Dubois, B. (2006). Apathy and the functional anatomy of the prefrontal cortex-basal ganglia circuits. *Cereb Cortex*, 16(7), 916-928. doi:10.1093/cercor/bhj043
- Levy, R., Lang, A. E., Dostrovsky, J. O., Pahapill, P., Romas, J., Saint-Cyr, J., . . . Lozano, A. M. (2001). Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. *Brain*, 124(Pt 10), 2105-2118. doi:10.1093/brain/124.10.2105
- LeWitt, P. A., Rezai, A. R., Leehey, M. A., Ojemann, S. G., Flaherty, A. W., Eskandar, E. N., . . . Feigin, A. (2011). AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol*, 10(4), 309-319. doi:10.1016/s1474-4422(11)70039-4
- Li, J. Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., . . . Brundin, P. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med*, 14(5), 501-503. doi:10.1038/nm1746
- Li, W., Englund, E., Widner, H., Mattsson, B., van Westen, D., Lätt, J., . . . Li, J. Y. (2016). Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(23), 6544-6549. doi:10.1073/pnas.1605245113
- Li, X., Patel, J. C., Wang, J., Avshalumov, M. V., Nicholson, C., Buxbaum, J. D., . . . Yue, Z. (2010). Enhanced striatal dopamine transmission and motor performance with LRRK2 overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S. *J Neurosci*, 30(5), 1788-1797. doi:10.1523/jneurosci.5604-09.2010
- Lindström, V., Fagerqvist, T., Nordström, E., Eriksson, F., Lord, A., Tucker, S., . . . Ingelsson, M. (2014). Immunotherapy targeting α -synuclein protofibrils reduced pathology in (Thy-1)-h[A30P] α -synuclein mice. *Neurobiol Dis*, 69, 134-143. doi:10.1016/j.nbd.2014.05.009

- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., . . . et al. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, *247*(4942), 574-577. doi:10.1126/science.2105529
- Lindvall, O., Rehnström, S., Gustavii, B., Brundin, P., Aastedt, B., Widner, H., . . . Olson, L. (1988). Fetal dopamine-rich mesencephalic grafts in Parkinson's disease. *Lancet*, *2*(8626-8627), 1483-1484. doi:10.1016/s0140-6736(88)90950-6
- Liu, R., Gao, X., Lu, Y., & Chen, H. (2011). Meta-analysis of the relationship between Parkinson disease and melanoma. *Neurology*, *76*(23), 2002-2009. doi:10.1212/WNL.0b013e31821e554e
- Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Privé, G. G., Eisenberg, D., . . . Edwards, R. H. (1992). A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell*, *70*(4), 539-551. doi:10.1016/0092-8674(92)90425-c
- Liu, Y., Yue, F., Tang, R., Tao, G., Pan, X., Zhu, L., . . . Chan, P. (2014). Progressive loss of striatal dopamine terminals in MPTP-induced acute parkinsonism in cynomolgus monkeys using vesicular monoamine transporter type 2 PET imaging ([¹⁸F]JAV-133). *Neurosci Bull*, *30*(3), 409-416. doi:10.1007/s12264-013-1374-3
- Lo Bianco, C., Ridet, J. L., Schneider, B. L., Deglon, N., & Aebischer, P. (2002). alpha-Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(16), 10813-10818. doi:10.1073/pnas.152339799
- Longhena, F., Faustini, G., & Bellucci, A. (2020). Study of alpha-synuclein fibrillation: state of the art and expectations. *Neural Regen Res*, *15*(1), 59-60. doi:10.4103/1673-5374.264453
- Love, S., Plaha, P., Patel, N. K., Hotton, G. R., Brooks, D. J., & Gill, S. S. (2005). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. *Nat Med*, *11*(7), 703-704. doi:10.1038/nm0705-703
- Lu-Nguyen, N. B., Broadstock, M., Schliesser, M. G., Bartholomae, C. C., von Kalle, C., Schmidt, M., & Yáñez-Muñoz, R. J. (2014). Transgenic expression of human glial cell line-derived neurotrophic factor from integration-deficient lentiviral vectors is neuroprotective in a rodent model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther*, *25*(7), 631-641. doi:10.1089/hum.2014.003
- Lu, X. H., Fleming, S. M., Meurers, B., Ackerson, L. C., Mortazavi, F., Lo, V., . . . Yang, X. W. (2009). Bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein. *J Neurosci*, *29*(7), 1962-1976. doi:10.1523/jneurosci.5351-08.2009
- Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2012). Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, *338*(6109), 949-953. doi:10.1126/science.1227157
- Luk, K. C., Kehm, V. M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2012). Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J Exp Med*, *209*(5), 975-986. doi:10.1084/jem.20112457
- Luk, K. C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J. R., Brunden, K. R., . . . Lee, V. M. (2009). Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(47), 20051-20056. doi:10.1073/pnas.0908005106
- Luo, J., Kaplitt, M. G., Fitzsimons, H. L., Zuzga, D. S., Liu, Y., Oshinsky, M. L., & During, M. J. (2002). Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. *Science*, *298*(5592), 425-429. doi:10.1126/science.1074549
- Ma, Y., Feigin, A., Dhawan, V., Fukuda, M., Shi, Q., Greene, P., . . . Eidelberg, D. (2002). Dyskinesia after fetal cell transplantation for parkinsonism: a PET study. *Ann Neurol*, *52*(5), 628-634. doi:10.1002/ana.10359
- Machiya, Y., Hara, S., Arawaka, S., Fukushima, S., Sato, H., Sakamoto, M., . . . Kato, T. (2010). Phosphorylated alpha-synuclein at Ser-129 is targeted to the proteasome pathway in a ubiquitin-independent manner. *J Biol Chem*, *285*(52), 40732-40744. doi:10.1074/jbc.M110.141952

- Macpherson, T., & Hikida, T. (2019). Role of basal ganglia neurocircuitry in the pathology of psychiatric disorders. *Psychiatry Clin Neurosci*, *73*(6), 289-301. doi:10.1111/pcn.12830
- Madrazo, I., León, V., Torres, C., Aguilera, M. C., Varela, G., Alvarez, F., . . . et al. (1988). Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med*, *318*(1), 51. doi:10.1056/nejm198801073180115
- Malfertheiner, K., Stefanova, N., & Heras-Garvin, A. (2021). The Concept of α -Synuclein Strains and How Different Conformations May Explain Distinct Neurodegenerative Disorders. *Front Neurol*, *12*, 737195. doi:10.3389/fneur.2021.737195
- Mandel, J. S., Adami, H. O., & Cole, P. (2012). Paraquat and Parkinson's disease: an overview of the epidemiology and a review of two recent studies. *Regul Toxicol Pharmacol*, *62*(2), 385-392. doi:10.1016/j.yrtph.2011.10.004
- Mandel, R. J., Rendahl, K. G., Spratt, S. K., Snyder, R. O., Cohen, L. K., & Leff, S. E. (1998). Characterization of intrastriatal recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer of human tyrosine hydroxylase and human GTP-cyclohydrolase I in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, *18*(11), 4271-4284. doi:10.1523/jneurosci.18-11-04271.1998
- Manfredsson, F. P., Burger, C., Rising, A. C., Zuobi-Hasona, K., Sullivan, L. F., Lewin, A. S., . . . Mandel, R. J. (2009). Tight Long-term dynamic doxycycline responsive nigrostriatal GDNF using a single rAAV vector. *Mol Ther*, *17*(11), 1857-1867. doi:10.1038/mt.2009.196
- Manning-Bog, A. B., McCormack, A. L., Li, J., Uversky, V. N., Fink, A. L., & Di Monte, D. A. (2002). The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem*, *277*(3), 1641-1644. doi:10.1074/jbc.C100560200
- Marks, W. J., Jr., Bartus, R. T., Siffert, J., Davis, C. S., Lozano, A., Boullis, N., . . . Olanow, C. W. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol*, *9*(12), 1164-1172. doi:10.1016/s1474-4422(10)70254-4
- Marks, W. J., Jr., Ostrem, J. L., Verhagen, L., Starr, P. A., Larson, P. S., Bakay, R. A., . . . Bartus, R. T. (2008). Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol*, *7*(5), 400-408. doi:10.1016/s1474-4422(08)70065-6
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, *8*(8), 2804-2815. doi:10.1523/jneurosci.08-08-02804.1988
- Marras, C., Hincapié, C. A., Kristman, V. L., Cancelliere, C., Soklaridis, S., Li, A., . . . Cassidy, J. D. (2014). Systematic review of the risk of Parkinson's disease after mild traumatic brain injury: results of the International Collaboration on Mild Traumatic Brain Injury Prognosis. *Arch Phys Med Rehabil*, *95*(3 Suppl), S238-244. doi:10.1016/j.apmr.2013.08.298
- Martinez-Martin, P. (2011). The importance of non-motor disturbances to quality of life in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, *310*(1-2), 12-16. doi:10.1016/j.jns.2011.05.006
- Masilamoni, G. J., & Smith, Y. (2017). Chronic MPTP administration regimen in monkeys: a model of dopaminergic and non-dopaminergic cell loss in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. doi:10.1007/s00702-017-1774-z
- Masilamoni, G. J., & Smith, Y. (2018). Chronic MPTP administration regimen in monkeys: a model of dopaminergic and non-dopaminergic cell loss in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, *125*(3), 337-363. doi:10.1007/s00702-017-1774-z
- Masilamoni, G. J., Weinkle, A., Papa, S. M., & Smith, Y. (2021). Cortical Serotonergic and Catecholaminergic Denervation in MPTP-Treated Parkinsonian Monkeys. *Cereb Cortex*. doi:10.1093/cercor/bhab313
- Masliah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., . . . Schenk, D. (2005). Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron*, *46*(6), 857-868. doi:10.1016/j.neuron.2005.05.010

- Mata, F., Sallum, I., Miranda, D. M., Bechara, A., & Malloy-Diniz, L. F. (2013). Do general intellectual functioning and socioeconomic status account for performance on the Children's Gambling Task? *Front Neurosci*, *7*, 68. doi:10.3389/fnins.2013.00068
- Matera, R., Outes, D., Rios, E., & Barboza, E. (1962). [Cooper's pallidotomy versus stereotaxic thalamotomy. Comparison of results in 1 and the same patient. Presentation of 2 operated cases]. *Sem Med*, *121*, 1043-1044.
- McCann, H., Stevens, C. H., Cartwright, H., & Halliday, G. M. (2014). α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism Relat Disord*, *20 Suppl 1*, S62-67. doi:10.1016/s1353-8020(13)70017-8
- McCormack, A. L., Thiruchelvam, M., Manning-Bog, A. B., Thiffault, C., Langston, J. W., Cory-Slechta, D. A., & Di Monte, D. A. (2002). Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis*, *10*(2), 119-127. doi:10.1006/nbdi.2002.0507
- McDowell, K. A., Shin, D., Roos, K. P., & Chesselet, M. F. (2014). Sleep dysfunction and EEG alterations in mice overexpressing alpha-synuclein. *J Parkinsons Dis*, *4*(3), 531-539. doi:10.3233/jpd-140374
- Melki, R. (2015). Role of Different Alpha-Synuclein Strains in Synucleinopathies, Similarities with other Neurodegenerative Diseases. *J Parkinsons Dis*, *5*(2), 217-227. doi:10.3233/jpd-150543
- Melki, R. (2018). Alpha-synuclein and the prion hypothesis in Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)*, *174*(9), 644-652. doi:10.1016/j.neurol.2018.08.002
- Milanese, C., Cerri, S., Ulusoy, A., Gornati, S. V., Plat, A., Gabriels, S., . . . Mastroberardino, P. G. (2018). Activation of the DNA damage response in vivo in synucleinopathy models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*, *9*(8), 818. doi:10.1038/s41419-018-0848-7
- Miller, G. W., Gainetdinov, R. R., Levey, A. I., & Caron, M. G. (1999). Dopamine transporters and neuronal injury. *Trends Pharmacol Sci*, *20*(10), 424-429. doi:10.1016/s0165-6147(99)01379-6
- Mínguez-Castellanos, A., Escamilla-Sevilla, F., Hotton, G. R., Toledo-Aral, J. J., Ortega-Moreno, A., Méndez-Ferrer, S., . . . López-Barneo, J. (2007). Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *78*(8), 825-831. doi:10.1136/jnnp.2006.106021
- Mittermeyer, G., Christine, C. W., Rosenbluth, K. H., Baker, S. L., Starr, P., Larson, P., . . . Bankiewicz, K. S. (2012). Long-term evaluation of a phase 1 study of AADC gene therapy for Parkinson's disease. *Hum Gene Ther*, *23*(4), 377-381. doi:10.1089/hum.2011.220
- Morgenthaler, T., Alessi, C., Friedman, L., Owens, J., Kapur, V., Boehlecke, B., . . . Swick, T. J. (2007). Practice parameters for the use of actigraphy in the assessment of sleep and sleep disorders: an update for 2007. *Sleep*, *30*(4), 519-529. doi:10.1093/sleep/30.4.519
- Moschos, M. M., Tagaris, G., Markopoulos, I., Margetis, I., Tsapakis, S., Kanakis, M., & Koutsandrea, C. (2011). Morphologic changes and functional retinal impairment in patients with Parkinson disease without visual loss. *Eur J Ophthalmol*, *21*(1), 24-29. doi:10.5301/ejo.2010.1318
- Mougenot, A. L., Nicot, S., Bencsik, A., Morignat, E., Verchère, J., Lakhdar, L., . . . Baron, T. (2012). Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*, *33*(9), 2225-2228. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.022
- Mounayar, S., Boulet, S., Tande, D., Jan, C., Pessiglione, M., Hirsch, E. C., . . . Tremblay, L. (2007). A new model to study compensatory mechanisms in MPTP-treated monkeys exhibiting recovery. *Brain*, *130*(Pt 11), 2898-2914. doi:10.1093/brain/awm208
- Mouradian, M. M., Juncos, J. L., Fabbrini, G., & Chase, T. N. (1987). Motor fluctuations in Parkinson's disease: pathogenetic and therapeutic studies. *Ann Neurol*, *22*(4), 475-479. doi:10.1002/ana.410220406
- Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Shizuma, N., Kawasaki, K., Ono, F., . . . Ozawa, K. (2002). Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther*, *13*(3), 345-354. doi:10.1089/10430340252792486

- Muramatsu, S., Fujimoto, K., Kato, S., Mizukami, H., Asari, S., Ikeguchi, K., . . . Nakano, I. (2010). A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther*, *18*(9), 1731-1735. doi:10.1038/mt.2010.135
- Naidoo, J., & Young, D. (2012). Gene regulation systems for gene therapy applications in the central nervous system. *Neurol Res Int*, *2012*, 595410. doi:10.1155/2012/595410
- Namura, I., Douillet, P., Sun, C. J., Pert, A., Cohen, R. M., & Chiueh, C. C. (1987). MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridine) is a neurotoxin to dopamine-, norepinephrine- and serotonin-containing neurons. *Eur J Pharmacol*, *136*(1), 31-37. doi:10.1016/0014-2999(87)90775-8
- Niethammer, M., Tang, C. C., LeWitt, P. A., Rezaei, A. R., Leehey, M. A., Ojemann, S. G., . . . Feigin, A. (2017). Long-term follow-up of a randomized AAV2-GAD gene therapy trial for Parkinson's disease. *JCI Insight*, *2*(7), e90133. doi:10.1172/jci.insight.90133
- Niu, Y., Guo, X., Chen, Y., Wang, C. E., Gao, J., Yang, W., . . . Li, X. J. (2015). Early Parkinson's disease symptoms in alpha-synuclein transgenic monkeys. *Hum Mol Genet*, *24*(8), 2308-2317. doi:10.1093/hmg/ddu748
- Nutt, J. G. (2001). Motor fluctuations and dyskinesia in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, *8*(2), 101-108.
- Nutt, J. G., Burchiel, K. J., Comella, C. L., Jankovic, J., Lang, A. E., Laws, E. R., Jr., . . . Wooten, G. F. (2003). Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology*, *60*(1), 69-73. doi:10.1212/wnl.60.1.69
- Nutt, J. G., Curtze, C., Hiller, A., Anderson, S., Larson, P. S., Van Laar, A. D., . . . Christine, C. W. (2020). Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene Therapy Enhances Levodopa Response in Parkinson's Disease. *Mov Disord*, *35*(5), 851-858. doi:10.1002/mds.27993
- Nyberg, P., Adolfsson, R., Hardy, J. A., Nordberg, A., Wester, P., & Winblad, B. (1985). Catecholamine topochemistry in human basal ganglia. Comparison between normal and Alzheimer brains. *Brain Res*, *333*(1), 139-142. doi:10.1016/0006-8993(85)90133-7
- Okuzumi, A., Kurosawa, M., Hatano, T., Takanashi, M., Nojiri, S., Fukuhara, T., . . . Nukina, N. (2018). Rapid dissemination of alpha-synuclein seeds through neural circuits in an in-vivo prion-like seeding experiment. *Acta Neuropathol Commun*, *6*(1), 96. doi:10.1186/s40478-018-0587-0
- Olanow, C. W., Goetz, C. G., Kordower, J. H., Stoessl, A. J., Sossi, V., Brin, M. F., . . . Freeman, T. B. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *54*(3), 403-414. doi:10.1002/ana.10720
- Olanow, C. W., & Kordower, J. H. (2017). Targeting α -Synuclein as a therapy for Parkinson's disease: The battle begins. *Mov Disord*, *32*(2), 203-207. doi:10.1002/mds.26935
- Oliveras-Salva, M., Van der Perren, A., Casadei, N., Stroobants, S., Nuber, S., D'Hooge, R., . . . Baekelandt, V. (2013). rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Mol Neurodegener*, *8*, 44. doi:10.1186/1750-1326-8-44
- Ondo, W. G. (2011). Motor complications in Parkinson's disease. *Int J Neurosci*, *121 Suppl 2*, 37-44. doi:10.3109/00207454.2011.620198
- Ortuño-Lizarán, I., Sánchez-Sáez, X., Lax, P., Serrano, G. E., Beach, T. G., Adler, C. H., & Cuenca, N. (2020). Dopaminergic retinal cell loss and visual dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. doi:10.1002/ana.25897
- Oueslati, A. (2016). Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *J Parkinsons Dis*, *6*(1), 39-51. doi:10.3233/jpd-160779
- Oueslati, A., Schneider, B. L., Aebischer, P., & Lashuel, H. A. (2013). Polo-like kinase 2 regulates selective autophagic α -synuclein clearance and suppresses its toxicity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(41), E3945-3954. doi:10.1073/pnas.1309991110
- Ovadia, A., Zhang, Z., & Gash, D. M. (1995). Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys. *Neurobiol Aging*, *16*(6), 931-937. doi:10.1016/0197-4580(95)02012-8
- Ovallath, S., & Deepa, P. (2013). The history of parkinsonism: descriptions in ancient Indian medical literature. *Mov Disord*, *28*(5), 566-568. doi:10.1002/mds.25420

- Page, R. D. (1992). The use of thalamotomy in the treatment of levodopa-induced dyskinesia. *Acta Neurochir (Wien)*, *114*(3-4), 77-117. doi:10.1007/bf01400598
- Pagonabarraga, J., Kulisevsky, J., Strafella, A. P., & Krack, P. (2015). Apathy in Parkinson's disease: clinical features, neural substrates, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol*, *14*(5), 518-531. doi:10.1016/s1474-4422(15)00019-8
- Palacios, N., Gao, X., McCullough, M. L., Schwarzschild, M. A., Shah, R., Gapstur, S., & Ascherio, A. (2012). Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Mov Disord*, *27*(10), 1276-1282. doi:10.1002/mds.25076
- Palfi, S., Gurruchaga, J. M., Lepetit, H., Howard, K., Ralph, G. S., Mason, S., . . . 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. *Hum Gene Ther Clin Dev*, *29*(3), 148-155. doi:10.1089/humc.2018.081
- Palfi, S., Gurruchaga, J. M., Ralph, G. S., Lepetit, H., Lavis, S., Buttery, P. C., . . . Mitrophanous, K. A. (2014). Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*, *383*(9923), 1138-1146. doi:10.1016/s0140-6736(13)61939-x
- Palfi, S., Leventhal, L., Chu, Y., Ma, S. Y., Emborg, M., Bakay, R., . . . Kordower, J. H. (2002). Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration. *J Neurosci*, *22*(12), 4942-4954.
- Papa, S. M., & Chase, T. N. (1996). Levodopa-induced dyskinesias improved by a glutamate antagonist in Parkinsonian monkeys. *Ann Neurol*, *39*(5), 574-578. doi:10.1002/ana.410390505
- Papavasiliou, P. S., Cotzias, G. C., Düby, S. E., Steck, A. J., Fehling, C., & Bell, M. A. (1972). Levodopa in Parkinsonism: potentiation of central effects with a peripheral inhibitor. *N Engl J Med*, *286*(1), 8-14. doi:10.1056/nejm197201062860102
- Paquette, M. A., Martinez, A. A., Macheda, T., Meshul, C. K., Johnson, S. W., Berger, S. P., & Giuffrida, A. (2012). Anti-dyskinetic mechanisms of amantadine and dextromethorphan in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease: role of NMDA vs. 5-HT1A receptors. *Eur J Neurosci*, *36*(9), 3224-3234. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08243.x
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, *14*(2), 223-236; discussion 222. doi:10.1176/jnp.14.2.223
- Parmar, M., Grealish, S., & Henchcliffe, C. (2020). The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*, *21*(2), 103-115. doi:10.1038/s41583-019-0257-7
- Pasternak, B., Svanström, H., Nielsen, N. M., Fugger, L., Melbye, M., & Hviid, A. (2012). Use of calcium channel blockers and Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*, *175*(7), 627-635. doi:10.1093/aje/kwr362
- Pastor, M. A., Jahanshahi, M., Artieda, J., & Obeso, J. A. (1992). Performance of repetitive wrist movements in Parkinson's disease. *Brain*, *115* (Pt 3), 875-891. doi:10.1093/brain/115.3.875
- Patel, N. K., Bunnage, M., Plaha, P., Svendsen, C. N., Heywood, P., & Gill, S. S. (2005). Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann Neurol*, *57*(2), 298-302. doi:10.1002/ana.20374
- Patterson, J. R., Polinski, N. K., Duffy, M. F., Kemp, C. J., Luk, K. C., Volpicelli-Daley, L. A., . . . Sortwell, C. E. (2019). Generation of Alpha-Synuclein Preformed Fibrils from Monomers and Use In Vivo. *J Vis Exp*(148). doi:10.3791/59758
- Paumier, K. L., Luk, K. C., Manfredsson, F. P., Kanaan, N. M., Lipton, J. W., Collier, T. J., . . . Sortwell, C. E. (2015). Intrastriatal injection of pre-formed mouse α -synuclein fibrils into rats triggers α -synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. *Neurobiol Dis*, *82*, 185-199. doi:10.1016/j.nbd.2015.06.003
- Peelaerts, W., Bousset, L., Baekelandt, V., & Melki, R. (2018). α -Synuclein strains and seeding in Parkinson's disease, incidental Lewy body disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy: similarities and differences. *Cell Tissue Res*, *373*(1), 195-212. doi:10.1007/s00441-018-2839-5

- Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., . . . Baekelandt, V. (2015). alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature*, *522*(7556), 340-344. doi:10.1038/nature14547
- Peng, C., Gathagan, R. J., & Lee, V. M. (2018). Distinct α -Synuclein strains and implications for heterogeneity among α -Synucleinopathies. *Neurobiol Dis*, *109*(Pt B), 209-218. doi:10.1016/j.nbd.2017.07.018
- Peng, H., Chau, V. Q., Phetsang, W., Sebastian, R. M., Stone, M. R. L., Datta, S., . . . Hulleman, J. D. (2019). Non-antibiotic Small-Molecule Regulation of DHFR-Based Destabilizing Domains In Vivo. *Mol Ther Methods Clin Dev*, *15*, 27-39. doi:10.1016/j.omtm.2019.08.002
- Peng, X., Tehranian, R., Dietrich, P., Stefanis, L., & Perez, R. G. (2005). Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci*, *118*(Pt 15), 3523-3530. doi:10.1242/jcs.02481
- Pérez-Otaño, I., Oset, C., Luquin, M. R., Herrero, M. T., Obeso, J. A., & Del Río, J. (1994). MPTP-induced parkinsonism in primates: pattern of striatal dopamine loss following acute and chronic administration. *Neurosci Lett*, *175*(1-2), 121-125. doi:10.1016/0304-3940(94)91094-4
- Perez, F. A., & Palmiter, R. D. (2005). Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(6), 2174-2179. doi:10.1073/pnas.0409598102
- Perez, R. G., Waymire, J. C., Lin, E., Liu, J. J., Guo, F., & Zigmond, M. J. (2002). A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci*, *22*(8), 3090-3099. doi:10.1523/jneurosci.22-08-03090.2002
- Perlow, M. J., Freed, W. J., Hoffer, B. J., Seiger, A., Olson, L., & Wyatt, R. J. (1979). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*, *204*(4393), 643-647. doi:10.1126/science.571147
- Pessiglione, M., Guehl, D., Agid, Y., Hirsch, E. C., Féger, J., & Tremblay, L. (2003). Impairment of context-adapted movement selection in a primate model of presymptomatic Parkinson's disease. *Brain*, *126*(Pt 6), 1392-1408. doi:10.1093/brain/awg139
- Pessiglione, M., Guehl, D., Hirsch, E. C., Feger, J., & Tremblay, L. (2004). Disruption of self-organized actions in monkeys with progressive MPTP-induced parkinsonism. I. Effects of task complexity. *Eur J Neurosci*, *19*(2), 426-436. doi:10.1111/j.0953-816x.2003.03088.x
- Pessiglione, M., Seymour, B., Flandin, G., Dolan, R. J., & Frith, C. D. (2006). Dopamine-dependent prediction errors underpin reward-seeking behaviour in humans. *Nature*, *442*(7106), 1042-1045. doi:10.1038/nature05051
- Petry-Schmelzer, J. N., Krause, M., Dembek, T. A., Horn, A., Evans, J., Ashkan, K., . . . Dafsari, H. S. (2019). Non-motor outcomes depend on location of neurostimulation in Parkinson's disease. *Brain*, *142*(11), 3592-3604. doi:10.1093/brain/awz285
- Pieri, V., Diederich, N. J., Raman, R., & Goetz, C. G. (2000). Decreased color discrimination and contrast sensitivity in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, *172*(1), 7-11. doi:10.1016/s0022-510x(99)00204-x
- Poewe, W., & Mahlknecht, P. (2009). The clinical progression of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, *15 Suppl 4*, S28-32. doi:10.1016/s1353-8020(09)70831-4
- Politis, M., & Niccolini, F. (2015). Serotonin in Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, *277*, 136-145. doi:10.1016/j.bbr.2014.07.037
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., . . . Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, *276*(5321), 2045-2047.
- Porras, G., Li, Q., & Bezdard, E. (2012). Modeling Parkinson's disease in primates: The MPTP model. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(3), a009308. doi:10.1101/cshperspect.a009308
- Postuma, R. B., Aarsland, D., Barone, P., Burn, D. J., Hawkes, C. H., Oertel, W., & Ziemssen, T. (2012). Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord*, *27*(5), 617-626. doi:10.1002/mds.24996

- Potenza, M. N. (2009). The importance of animal models of decision making, gambling, and related behaviors: implications for translational research in addiction. *Neuropsychopharmacology*, *34*(13), 2623-2624. doi:10.1038/npp.2009.152
- Prakash, K. M., Nadkarni, N. V., Lye, W. K., Yong, M. H., & Tan, E. K. (2016). The impact of non-motor symptoms on the quality of life of Parkinson's disease patients: a longitudinal study. *Eur J Neurol*, *23*(5), 854-860. doi:10.1111/ene.12950
- Prakash, N., McFarthing, K., & Simuni, T. (2020). Clinical Trial Highlights - Parkinson's Disease Cognition. *J Parkinsons Dis*. doi:10.3233/jpd-209006
- Price, M. J., Feldman, R. G., Adelberg, D., & Kayne, H. (1992). Abnormalities in color vision and contrast sensitivity in Parkinson's disease. *Neurology*, *42*(4), 887-890. doi:10.1212/wnl.42.4.887
- Proctor, D., Williamson, R. A., Latzman, R. D., de Waal, F. B., & Brosnan, S. F. (2014). Gambling primates: reactions to a modified Iowa Gambling Task in humans, chimpanzees and capuchin monkeys. *Anim Cogn*, *17*(4), 983-995. doi:10.1007/s10071-014-0730-7
- Przedborski, S., & Jackson-Lewis, V. (1998). Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord*, *13 Suppl 1*, 35-38.
- Purisai, M. G., McCormack, A. L., Langston, W. J., Johnston, L. C., & Di Monte, D. A. (2005). Alpha-synuclein expression in the substantia nigra of MPTP-lesioned non-human primates. *Neurobiol Dis*, *20*(3), 898-906. doi:10.1016/j.nbd.2005.05.028
- Rabinak, C. A., & Nirenberg, M. J. (2010). Dopamine agonist withdrawal syndrome in Parkinson disease. *Arch Neurol*, *67*(1), 58-63. doi:10.1001/archneurol.2009.294
- Ramsay, R. R., Salach, J. I., & Singer, T. P. (1986). Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD+-linked substrates by MPP+. *Biochem Biophys Res Commun*, *134*(2), 743-748.
- Ravina, B., Marder, K., Fernandez, H. H., Friedman, J. H., McDonald, W., Murphy, D., . . . Goetz, C. (2007). Diagnostic criteria for psychosis in Parkinson's disease: report of an NINDS, NIMH work group. *Mov Disord*, *22*(8), 1061-1068. doi:10.1002/mds.21382
- Raza, C., Anjum, R., & Shakeel, N. U. A. (2019). Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci*, *226*, 77-90. doi:10.1016/j.lfs.2019.03.057
- Recasens, A., Dehay, B., Bove, J., Carballo-Carbajal, I., Dovero, S., Perez-Villalba, A., . . . Vila, M. (2014). Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol*, *75*(3), 351-362. doi:10.1002/ana.24066
- Regan, B. C., Freudenthaler, N., Kolle, R., Mollon, J. D., & Paulus, W. (1998). Colour discrimination thresholds in Parkinson's disease: results obtained with a rapid computer-controlled colour vision test. *Vision Res*, *38*(21), 3427-3431. doi:10.1016/s0042-6989(97)00402-1
- Riachi, N. J., Dietrich, W. D., & Harik, S. I. (1990). Effects of internal carotid administration of MPTP on rat brain and blood-brain barrier. *Brain Res*, *533*(1), 6-14. doi:10.1016/0006-8993(90)91788-i
- Rocca, W. A. (2018). The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective. *Lancet Neurol*, *17*(11), 928-929. doi:10.1016/s1474-4422(18)30355-7
- Rockenstein, E., Mallory, M., Hashimoto, M., Song, D., Shults, C. W., Lang, I., & Masliah, E. (2002). Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res*, *68*(5), 568-578. doi:10.1002/jnr.10231
- Roeltgen, D. P., & Schneider, J. S. (1991). Chronic low-dose MPTP in nonhuman primates: a possible model for attention deficit disorder. *J Child Neurol*, *6 Suppl*, S82-89. doi:10.1177/0883073891006001s10
- Roeltgen, D. P., & Schneider, J. S. (1994). Task persistence and learning ability in normal and chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Behav Brain Res*, *60*(2), 115-124. doi:10.1016/0166-4328(94)90138-4
- Sanberg, P. R. (1980). Haloperidol-induced catalepsy is mediated by postsynaptic dopamine receptors. *Nature*, *284*(5755), 472-473.

- Sánchez-Pernaute, R., Harvey-White, J., Cunningham, J., & Bankiewicz, K. S. (2001). Functional effect of adeno-associated virus mediated gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase into the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *Mol Ther*, *4*(4), 324-330. doi:10.1006/mthe.2001.0466
- Sanftner, L. M., Rivera, V. M., Suzuki, B. M., Feng, L., Berk, L., Zhou, S., . . . Cunningham, J. (2006). Dimerizer regulation of AADC expression and behavioral response in AAV-transduced 6-OHDA lesioned rats. *Mol Ther*, *13*(1), 167-174. doi:10.1016/j.ymthe.2005.06.480
- Santangelo, G., Barone, P., Trojano, L., & Vitale, C. (2013). Pathological gambling in Parkinson's disease. A comprehensive review. *Parkinsonism Relat Disord*, *19*(7), 645-653. doi:10.1016/j.parkreldis.2013.02.007
- Sardi, S. P., & Simuni, T. (2019). New Era in disease modification in Parkinson's disease: Review of genetically targeted therapeutics. *Parkinsonism Relat Disord*, *59*, 32-38. doi:10.1016/j.parkreldis.2018.10.025
- Sasaki, S., & Horie, Y. (2020). Association Between Olfactory Impairment and Disease Severity and Duration in Parkinson's Disease. *Mov Disord Clin Pract*, *7*(7), 820-826. doi:10.1002/mdc3.13028
- Sauer, H., & Oertel, W. H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, *59*(2), 401-415. doi:10.1016/0306-4522(94)90605-x
- Schenk, D. B., Koller, M., Ness, D. K., Griffith, S. G., Grundman, M., Zago, W., . . . Kinney, G. G. (2017). First-in-human assessment of PRX002, an anti- α -synuclein monoclonal antibody, in healthy volunteers. *Mov Disord*, *32*(2), 211-218. doi:10.1002/mds.26878
- Schmidt, N., & Ferger, B. (2001). Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, *108*(11), 1263-1282. doi:10.1007/s007020100004
- Schneider, J. S. (2006). *Frontiers in Neuroscience*

Modeling Cognitive Deficits Associated with Parkinsonism in the Chronic-Low-Dose MPTP-Treated Monkey. In E. D. Levin & J. J. Buccafusco (Eds.), *Animal Models of Cognitive Impairment*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis

Copyright © 2006, Taylor & Francis Group, LLC.

- Schneider, J. S., Giardiniere, M., & Morain, P. (2002). Effects of the prolyl endopeptidase inhibitor S 17092 on cognitive deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Neuropsychopharmacology*, *26*(2), 176-182. doi:10.1016/s0893-133x(01)00307-4
- Schneider, J. S., & Kovelowski, C. J., 2nd. (1990). Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys. *Brain Res*, *519*(1-2), 122-128.
- Schneider, J. S., Pioli, E. Y., Jianzhong, Y., Li, Q., & Bezard, E. (2013). Levodopa improves motor deficits but can further disrupt cognition in a macaque Parkinson model. *Mov Disord*, *28*(5), 663-667. doi:10.1002/mds.25258
- Schneider, J. S., & Pope-Coleman, A. (1995). Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey. *Neurodegeneration*, *4*(3), 245-255.
- Schneider, J. S., & Roeltgen, D. P. (1993). Delayed matching-to-sample, object retrieval, and discrimination reversal deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Brain Res*, *615*(2), 351-354.
- Schneider, J. S., Tinker, J. P., Van Velson, M., Menzaghi, F., & Lloyd, G. K. (1999). Nicotinic acetylcholine receptor agonist SIB-1508Y improves cognitive functioning in chronic low-dose MPTP-treated monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, *290*(2), 731-739.
- Schneider, J. S., Unguez, G., Yuwiler, A., Berg, S. C., & Markham, C. H. (1988). Deficits in operant behaviour in monkeys treated with N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Brain*, *111* (Pt 6), 1265-1285. doi:10.1093/brain/111.6.1265
- Schrag, A., & Taddei, R. N. (2017). Depression and Anxiety in Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol*, *133*, 623-655. doi:10.1016/bs.irn.2017.05.024

- Schultz, W., Romo, R., Scarnati, E., Sundström, E., Jonsson, G., & Studer, A. (1989). Saccadic reaction times, eye-arm coordination and spontaneous eye movements in normal and MPTP-treated monkeys. *Exp Brain Res*, *78*(2), 253-267. doi:10.1007/bf00228897
- Senova, S., Poupon, C., Dauguet, J., Stewart, H. J., Dugué, G. P., Jan, C., . . . Palfi, S. (2018). Optogenetic Tractography for anatomo-functional characterization of cortico-subcortical neural circuits in non-human primates. *Sci Rep*, *8*(1), 3362. doi:10.1038/s41598-018-21486-8
- Sethi, K. D. (2010). The impact of levodopa on quality of life in patients with Parkinson disease. *Neurologist*, *16*(2), 76-83. doi:10.1097/NRL.0b013e3181be6d15
- Shen, R. S., Abell, C. W., Gessner, W., & Brossi, A. (1985). Serotonergic conversion of MPTP and dopaminergic accumulation of MPP+. *FEBS Lett*, *189*(2), 225-230.
- Shen, Y., Huang, J. Y., Li, J., & Liu, C. F. (2018). Excessive Daytime Sleepiness in Parkinson's Disease: Clinical Implications and Management. *Chin Med J (Engl)*, *131*(8), 974-981. doi:10.4103/0366-6999.229889
- Shen, Y., Muramatsu, S. I., Ikeguchi, K., Fujimoto, K. I., Fan, D. S., Ogawa, M., . . . Ozawa, K. (2000). Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther*, *11*(11), 1509-1519. doi:10.1089/10430340050083243
- Shimizu, K., Ohtaki, K., Matsubara, K., Aoyama, K., Uezono, T., Saito, O., . . . Shiono, H. (2001). Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res*, *906*(1-2), 135-142. doi:10.1016/s0006-8993(01)02577-x
- Shimozawa, A., Ono, M., Takahara, D., Tarutani, A., Imura, S., Masuda-Suzukake, M., . . . Hasegawa, M. (2017). Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain. *Acta Neuropathol Commun*, *5*(1), 12. doi:10.1186/s40478-017-0413-0
- Siddique, Y. H. (2021). Does human alpha synuclein behave like prions? *CNS Neurol Disord Drug Targets*. doi:10.2174/1871527320666210420140123
- Sidransky, E., & Lopez, G. (2012). The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol*, *11*(11), 986-998. doi:10.1016/s1474-4422(12)70190-4
- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, *11*(3-4), 151-167.
- Skorvanek, M., Gdovinova, Z., Rosenberger, J., Saeedian, R. G., Nagyova, I., Groothoff, J. W., & van Dijk, J. P. (2015). The associations between fatigue, apathy, and depression in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, *131*(2), 80-87. doi:10.1111/ane.12282
- Slovin, H., Abeles, M., Vaadia, E., Haalman, I., Prut, Y., & Bergman, H. (1999). Frontal cognitive impairments and saccadic deficits in low-dose MPTP-treated monkeys. *J Neurophysiol*, *81*(2), 858-874.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, *388*(6645), 839-840. doi:10.1038/42166
- Stefani, A., & Högl, B. (2020). Sleep in Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*, *45*(1), 121-128. doi:10.1038/s41386-019-0448-y
- Stewart, H. J., Ralph, G. S., Fong-Wong, L., Strickland, I., McCloskey, L., Barnes, L., . . . Mitrophanous, K. A. (2016). Optimizing Transgene Configuration and Protein Fusions to Maximize Dopamine Production for the Gene Therapy of Parkinson's Disease. *Hum Gene Ther Clin Dev*, *27*(3), 100-110. doi:10.1089/humc.2016.056
- Stoessl, A. J. (2012). Neuroimaging in Parkinson's disease: from pathology to diagnosis. *Parkinsonism Relat Disord*, *18 Suppl 1*, S55-59. doi:10.1016/s1353-8020(11)70019-0
- Stoessl, A. J., Martin, W. W., McKeown, M. J., & Sossi, V. (2011). Advances in imaging in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, *10*(11), 987-1001. doi:10.1016/s1474-4422(11)70214-9
- Su, X., Kells, A. P., Huang, E. J., Lee, H. S., Hadaczek, P., Beyer, J., . . . Bankiewicz, K. S. (2009). Safety evaluation of AAV2-GDNF gene transfer into the dopaminergic nigrostriatal pathway in aged and parkinsonian rhesus monkeys. *Hum Gene Ther*, *20*(12), 1627-1640. doi:10.1089/hum.2009.103

- Sun, M., Zhang, G. R., Kong, L., Holmes, C., Wang, X., Zhang, W., . . . Geller, A. I. (2003). Correction of a rat model of Parkinson's disease by coexpression of tyrosine hydroxylase and aromatic amino acid decarboxylase from a helper virus-free herpes simplex virus type 1 vector. *Hum Gene Ther*, *14*(5), 415-424. doi:10.1089/104303403321467180
- Taffe, M. A. (2011). A comparison of intraperitoneal and subcutaneous temperature in freely moving rhesus macaques. *Physiol Behav*, *103*(5), 440-444. doi:10.1016/j.physbeh.2011.03.023
- Taylor, J. R., Elsworth, J. D., Roth, R. H., Sladek, J. R., Jr., & Redmond, D. E., Jr. (1990). Cognitive and motor deficits in the acquisition of an object retrieval/detour task in MPTP-treated monkeys. *Brain*, *113* (Pt 3), 617-637.
- Tehrani, R., Montoya, S. E., Van Laar, A. D., Hastings, T. G., & Perez, R. G. (2006). Alpha-synuclein inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells. *J Neurochem*, *99*(4), 1188-1196. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04146.x
- Thacker, E. L., O'Reilly, E. J., Weisskopf, M. G., Chen, H., Schwarzschild, M. A., McCullough, M. L., . . . Ascherio, A. (2007). Temporal relationship between cigarette smoking and risk of Parkinson disease. *Neurology*, *68*(10), 764-768. doi:10.1212/01.wnl.0000256374.50227.4b
- Thakur, P., Breger, L. S., Lundblad, M., Wan, O. W., Mattsson, B., Luk, K. C., . . . Björklund, A. (2017). Modeling Parkinson's disease pathology by combination of fibril seeds and α -synuclein overexpression in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(39), E8284-e8293. doi:10.1073/pnas.1710442114
- Theillet, F. X., Binolfi, A., Bekei, B., Martorana, A., Rose, H. M., Stuver, M., . . . Selenko, P. (2016). Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature*, *530*(7588), 45-50. doi:10.1038/nature16531
- Thenaisie, Y., Palmisano, C., Canessa, A., Keulen, B. J., Capetian, P., Jiménez, M. C., . . . Contarino, M. F. (2021). Towards adaptive deep brain stimulation: clinical and technical notes on a novel commercial device for chronic brain sensing. *J Neural Eng*, *18*(4). doi:10.1088/1741-2552/ac1d5b
- Thiele, S. L., Warre, R., & Nash, J. E. (2012). Development of a unilaterally-lesioned 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. *J Vis Exp*(60). doi:10.3791/3234
- Thiruchelvam, M., Brockel, B. J., Richfield, E. K., Baggs, R. B., & Cory-Slechta, D. A. (2000). Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res*, *873*(2), 225-234. doi:10.1016/s0006-8993(00)02496-3
- Tian, L., Xia, Y., Flores, H. P., Campbell, M. C., Moerlein, S. M., & Perlmutter, J. S. (2015). Neuroimaging Analysis of the Dopamine Basis for Apathetic Behaviors in an MPTP-Lesioned Primate Model. *PLoS One*, *10*(7), e0132064. doi:10.1371/journal.pone.0132064
- Tian, Y. Y., Tang, C. J., Wang, J. N., Feng, Y., Chen, X. W., Wang, L., . . . Sun, S. G. (2007). Favorable effects of VEGF gene transfer on a rat model of Parkinson disease using adeno-associated viral vectors. *Neurosci Lett*, *427*(3), 239-244. doi:10.1016/j.neulet.2007.05.033
- Tysnes, O. B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, *124*(8), 901-905. doi:10.1007/s00702-017-1686-y
- Uemura, N., Yagi, H., Uemura, M. T., Hatanaka, Y., Yamakado, H., & Takahashi, R. (2018). Inoculation of alpha-synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. *Mol Neurodegener*, *13*(1), 21. doi:10.1186/s13024-018-0257-5
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*, *5*(1), 107-110.
- Ungerstedt, U., Ljungberg, T., & Steg, G. (1974). Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine neurons. *Adv Neurol*, *5*, 421-426.
- Valles, F., Fiandaca, M. S., Eberling, J. L., Starr, P. A., Larson, P. S., Christine, C. W., . . . Bankiewicz, K. S. (2010). Qualitative imaging of adeno-associated virus serotype 2-human aromatic L-amino acid

- decarboxylase gene therapy in a phase I study for the treatment of Parkinson disease. *Neurosurgery*, 67(5), 1377-1385. doi:10.1227/NEU.0b013e3181f53a5c
- Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., & Nelson, L. M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*, 157(11), 1015-1022. doi:10.1093/aje/kwg068
- Van der Perren, A., Gelders, G., Fenyi, A., Bousset, L., Brito, F., Peelaerts, W., . . . Baekelandt, V. (2020). The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol*, 139(6), 977-1000. doi:10.1007/s00401-020-02157-3
- Varkey, J., Isas, J. M., Mizuno, N., Jensen, M. B., Bhatia, V. K., Jao, C. C., . . . Langen, R. (2010). Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J Biol Chem*, 285(42), 32486-32493. doi:10.1074/jbc.M110.139576
- Vezioli, J., Fifel, K., Leviel, V., Dehay, C., Kennedy, H., Cooper, H. M., . . . Procyk, E. (2011). Early presymptomatic and long-term changes of rest activity cycles and cognitive behavior in a MPTP-monkey model of Parkinson's disease. *PLoS One*, 6(8), e23952. doi:10.1371/journal.pone.0023952
- Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., Patel, T. P., Tanik, S. A., Riddle, D. M., Stieber, A., . . . Lee, V. M. (2011). Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron*, 72(1), 57-71. doi:10.1016/j.neuron.2011.08.033
- Voon, V., Napier, T. C., Frank, M. J., Sgambato-Faure, V., Grace, A. A., Rodriguez-Oroz, M., . . . Fernagut, P. O. (2017). Impulse control disorders and levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: an update. *Lancet Neurol*, 16(3), 238-250. doi:10.1016/s1474-4422(17)30004-2
- Warren Olanow, C., Bartus, R. T., Baumann, T. L., Factor, S., Boulis, N., Stacy, M., . . . Lang, A. E. (2015). Gene delivery of neurturin to putamen and substantia nigra in Parkinson disease: A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Neurol*, 78(2), 248-257. doi:10.1002/ana.24436
- Weintraub, D., Koester, J., Potenza, M. N., Siderowf, A. D., Stacy, M., Voon, V., . . . Lang, A. E. (2010). Impulse control disorders in Parkinson disease: a cross-sectional study of 3090 patients. *Arch Neurol*, 67(5), 589-595. doi:10.1001/archneurol.2010.65
- Wersinger, C., & Sidhu, A. (2003). Differential cytotoxicity of dopamine and H₂O₂ in a human neuroblastoma divided cell line transfected with alpha-synuclein and its familial Parkinson's disease-linked mutants. *Neurosci Lett*, 342(1-2), 124-128. doi:10.1016/s0304-3940(03)00212-x
- Wisor, J. P., Nishino, S., Sora, I., Uhl, G. H., Mignot, E., & Edgar, D. M. (2001). Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J Neurosci*, 21(5), 1787-1794. doi:10.1523/jneurosci.21-05-01787.2001
- Witjas-Slucki, T. (2018). Surgical treatments for tremors. *Rev Neurol (Paris)*, 174(9), 615-620. doi:10.1016/j.neurol.2018.07.004
- Wu, H., Ghekiere, H., Beeckmans, D., Tambuyzer, T., van Kuyck, K., Aerts, J. M., & Nuttin, B. (2015). Conceptualization and validation of an open-source closed-loop deep brain stimulation system in rat. *Sci Rep*, 4, 9921. doi:10.1038/srep09921
- Yang, W., Wang, G., Wang, C. E., Guo, X., Yin, P., Gao, J., . . . Li, X. J. (2015). Mutant alpha-synuclein causes age-dependent neuropathology in monkey brain. *J Neurosci*, 35(21), 8345-8358. doi:10.1523/jneurosci.0772-15.2015
- Yasuhara, T., Kameda, M., Sasaki, T., Tajiri, N., & Date, I. (2017). Cell Therapy for Parkinson's Disease. *Cell Transplant*, 26(9), 1551-1559. doi:10.1177/0963689717735411
- Yoo, H. S., Chung, S. J., Lee, Y. H., Ye, B. S., Sohn, Y. H., & Lee, P. H. (2019). Olfactory anosognosia is a predictor of cognitive decline and dementia conversion in Parkinson's disease. *J Neurol*, 266(7), 1601-1610. doi:10.1007/s00415-019-09297-x
- Yu, C., Cassar, I. R., Sambangi, J., & Grill, W. M. (2020). Frequency-Specific Optogenetic Deep Brain Stimulation of Subthalamic Nucleus Improves Parkinsonian Motor Behaviors. *J Neurosci*, 40(22), 4323-4334. doi:10.1523/jneurosci.3071-19.2020

Zafar, S., & Yaddanapudi, S. S. (2021). Parkinson Disease *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.

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. *Arch Neurol*, *60*(3), 337-341. doi:10.1001/archneur.60.3.337

Zhang, D., Jiang, H., & Xie, J. (2014). Alcohol intake and risk of Parkinson's disease: a meta-analysis of observational studies. *Mov Disord*, *29*(6), 819-822. doi:10.1002/mds.25863

Zhang, T. M., Yu, S. Y., Guo, P., Du, Y., Hu, Y., Piao, Y. S., . . . Zhang, W. (2016). Nonmotor symptoms in patients with Parkinson disease: A cross-sectional observational study. *Medicine (Baltimore)*, *95*(50), e5400. doi:10.1097/md.00000000000005400

Zhang, Z., Andersen, A., Smith, C., Grondin, R., Gerhardt, G., & Gash, D. (2000). Motor slowing and parkinsonian signs in aging rhesus monkeys mirror human aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *55*(10), B473-480. doi:10.1093/gerona/55.10.b473

Zhou, Y., Sun, M., Li, H., Yan, M., He, Z., Wang, W., . . . Lu, S. (2013). Recovery of behavioral symptoms in hemi-parkinsonian rhesus monkeys through combined gene and stem cell therapy. *Cytotherapy*, *15*(4), 467-480. doi:10.1016/j.jcyt.2013.01.007

Titre : Validation de nouveaux modèles et traitements de la maladie de Parkinson chez le primate non-humain

Mots clés : Maladie de Parkinson, Modèles animaux, Primate non-humain, Thérapie génique, MPTP, Alpha-synucléine

Résumé : La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée par des troubles moteurs, cognitifs, psychiatriques et autonomiques liés à 1) la perte de dopamine engendrée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire et leurs innervations dans le striatum ; 2) L'accumulation progressive de la protéine alpha-synucléine dans des corps de Lewy. L'administration de la neurotoxine MPTP permet de modéliser cette mort neuronale chez l'animal et de reproduire les symptômes moteurs chez le primate non-humain (PNH) mais peu d'information existe sur les symptômes non-moteurs dans ce modèle. La première partie de ma thèse a porté sur l'élaboration, la mise en œuvre et la validation d'outils permettant l'exploration des déficits fonctionnels non-moteurs tels que les déficits cognitifs et limbiques (via des tests sur écran tactile) et l'altération du cycle veille-sommeil (via le suivi de la température corporelle) dans le modèle MPTP chez le PNH. Dans la deuxième partie de ma thèse, ces nouveaux outils m'ont permis, d'évaluer l'effet thérapeutique sur les symptômes moteurs et non-moteurs d'une thérapie génique régulable ou constitutive obtenue par surexpression des trois enzymes nécessaires à la biosynthèse de la dopamine dans le striatum du PNH sévèrement parkinsonien.

Le modèle primate MPTP ne permet pas d'étudier l'effet de l'accumulation de l'alpha-synucléine caractéristique de la MP. C'est pour cela que la troisième partie de ma thèse porte sur l'élaboration et la caractérisation d'un nouveau modèle primate non-humain obtenu cette fois-ci par surexpression locale de différentes souches d'alpha-synucléine fibrillaire dans le striatum du PNH. L'ensemble de ces travaux ont pour objectif d'améliorer l'évaluation préclinique de nouvelles thérapies de la MP chez le PNH et donc leur prédictivité clinique.

Title : Validation of new models and treatments of Parkinson's disease in the non-human primate

Keywords : Parkinson's disease, Animal models, Non-human primate, Gene therapy, MPTP, Alpha-synuclein

Abstract : Parkinson's disease (PD) is characterized by motor, cognitive, psychiatric and autonomic deficits triggered by 1) the loss of dopamine caused by the neurodegeneration of the dopaminergic neurons of the substantia nigra and their afferent projections in the striatum ; 2) the progressive accumulation of alpha-synuclein protein in Lewy bodies. The administration of the MPTP neurotoxin allows to model this neuronal death in animals and to reproduce the resulting motor symptoms in non-human primates but little information is available regarding non-motor symptoms in this model. The first part of my thesis project consisted of designing, implementing and validating new tools allowing the exploration of other functional deficits such as cognitive and limbic deficits (through touch screen tests) and activity-rest cycle alteration (through body temperature follow-up) in the non-human primate MPTP model. The second part of my thesis project explored the use of these new tools to evaluate the therapeutic effect on motor and non-motor symptoms of tunable or constitutively active a gene therapy strategy where the three key enzymes necessary to the production of dopamine are overexpressed in the striatum of severely parkinsonian primates.

Finally, the MPTP primate model doesn't allow us to study the effect of the accumulation of alpha-synuclein which is a main feature of Parkinson's disease. Thus, the third part of my

thesis consisted in designing and characterizing a new non-human primate model of Parkinson's disease obtained by local overexpression of different alpha-synuclein fibrillar strains in the striatum. All these results aim to improve the preclinical evaluation of new therapies for PD in NHP models and therefore their clinical predictivity.