



HAL
open science

Etude des modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine dans deux modèles murins surexprimant l'alpha-synucléine humaine A53T

Habiba Tlili

► **To cite this version:**

Habiba Tlili. Etude des modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine dans deux modèles murins surexprimant l'alpha-synucléine humaine A53T. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03347933

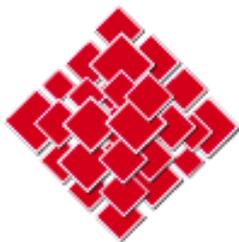
HAL Id: hal-03347933

<https://ephe.hal.science/hal-03347933>

Submitted on 17 Sep 2021

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

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



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par TLILI Habiba

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Etude des modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine dans deux modèles murins surexprimant l'alpha-synucléine humaine A53T

Soutenu le 19 Janvier 2021 devant le jury suivant :

Madame ROSSEL Mireille : Présidente
Monsieur BARON Thierry : Tuteur scientifique
Madame PAUL Catherine : Tuteur pédagogique
Monsieur PEYRIN Jean-Michel : Rapporteur
Monsieur CHAUVEAU Fabien : Examineur

Mémoire préparé sous la direction de : Monsieur BARON Thierry - Laboratoire de l'ANSES de Lyon, unité Maladie neurodégénérative
Directeur : LEMPEREUR Laurent

Et de

Madame PAUL Catherine - EA7269 EPHE - Université de Bourgogne
Laboratoire d'immunologie et immunothérapie des cancers de l'EPHE UFR
Sciences de Santé

Etude des modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine dans un modèle murin surexprimant l'alpha-synucléine humaine A53T

TLILI Habiba

19 janvier 2021

Résumé

Les synucléinopathies sont des maladies neurodégénératives caractérisées par la présence d'agrégats anormaux d'alpha-synucléine au sein des cellules nerveuses. Elles regroupent principalement : la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée. Concernant la maladie de parkinson, les patients présentent comme symptômes majeurs de la maladie, des tremblements au repos, une akinésie et/ou une rigidité. Cette maladie, d'un point de vue anatomo-pathologique, se définit par une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire, et bien que les causes biochimiques ne soient pas clairement identifiées, l'agrégation de la protéine alpha-synucléine est intimement liée aux mécanismes conduisant à la dégénérescence progressive de ces cellules nerveuses.

L'alpha-synucléine est une protéine de la famille des synucléines qui est principalement exprimée dans le système nerveux central. En condition physiologique, différents états conformationnels (monomères, dimères, oligomères) cohabitent en équilibre dans la cellule. Toutefois, les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, troncation, nitration, oxydation, sumoylation) peuvent moduler la structure de la protéine alpha-synucléine et favoriser son agrégation.

Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié les modifications post-traductionnelles présentes dans deux modèles surexprimant l'alpha-synucléine humaine mutée en A53T. Puis, nous avons travaillé sur les modifications de l'alpha-synucléine, après une exposition chronique au paraquat par eau de boisson à la concentration de 10mg/kg/jour.

Pour cela nous avons employé trois modèles dans ces travaux, un modèle transgénique surexprimant l'alpha-synucléine humaine A53T sous le promoteur prion, le modèle M83. Ensuite, les travaux se sont poursuivis sur un modèle d'inoculation de fibrilles et d'agrégat d'alpha-synucléine et sur la lignée C57Bl6 KO en alpha-synucléine inoculé avec des adénovirus d'alpha-synucléine humaine mutée en A53T.

Nos résultats témoignent de la présence d'alpha-synucléine sous la forme d'immunomarquage cytoplasmique, localisé dans les régions postérieures du cerveau, soit le mésencéphale et le tronc cérébral dans le modèle M83. Il existe aussi, des immunomarquages présents dans le noyau des cellules au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe. Lorsque l'on associe la protéinase K à cette étude, ces mêmes immunomarquages sont résistants à cette enzyme avec l'anticorps Ab51253.

Les animaux inoculés par des fibrilles et des agrégats d'alpha-synucléine exprime la protéine sous la forme d'immunomarquages principalement cytoplasmiques présents dans la partie postérieure du cerveau.

Contrairement à ces modèles, dans le modèle C57Bl6 KO alpha-synucléine inoculé par des adénovirus, la protéine est présente dans les noyaux des cellules au niveau du cortex cérébral et du bulbe olfactif.

Concernant, les expositions au paraquat, seul le modèle M83 exposé exprime une augmentation de la protéine en présence de la protéinase K dans le cortex cérébral par rapport au témoin non traité.

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais d'abord remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail

Merci à Thierry Baron, mon tuteur scientifique, pour m'avoir permis de réaliser ce projet de diplôme EPHE en Science et vie de la Terre, m'avoir accompagné, guidé et fait confiance lors de mon recrutement, il y a 3 ans et demi.

Merci à Paul Catherine ma tutrice pédagogique, pour son soutien, son aide et sa disponibilité.

Merci à l'équipe de la MND de m'avoir intégré si rapidement et autant appris. Mami Domi, Clairette, Jérémy, Coco, Dominique, Anne-Gaëlle, Johann, ma copine Laila et à notre super Jean-Noël, le grand frère de la MND par sa gentillesse, sa disponibilité, son savoir et son grand cœur.

Merci à cette superbe équipe pour leur soutien infailible durant la période de mon mémoire, pour nos longues discussions sur la cuisine (les tacos la référence, les tiramisus et plein d'autres plats sains bien entendu), nos moments de rigolade et de partage ☺

Merci à toutes les personnes de l'ANSES de Lyon.

Merci à Coralie et Martine que j'ai connu à l'ANSES, avec qui les pauses déjeuner était un super moment de partage et de gentillesse en compagnie de mami Domi.

Merci à mes proches, ma famille, en particulier mes parents qui m'ont toujours soutenue malgré les épreuves aussi dure soit elle, et d'avoir toujours cru en moi.

Merci à mes superbes copines : Lucie, Virginie, Fiona, Pasquina, Celimata, Mélissa d'avoir toujours été là, pour votre soutien et votre sincérité.

Merci à toi, d'avoir toujours été là pour moi, m'avoir soutenu à chaque instant et de m'avoir poussé à réussir malgré les difficultés.

TABLE DES MATIERES

<u>Introduction</u>	page 15
<u>I. Les synucléinopathies</u>	page 15
1. La maladie de Parkinson (MP)	page 15
a. Troubles précoces de la maladie de Parkinson.....	page 15
b. Tremblement au repos.....	page 16
c. Akinésie (lenteur des mouvements)	page 16
d. Rigidité (posture voûtée)	page 16
e. Pertes de mémoire	page 17
f. Changement de comportement	page 17
2. L’histoire de la maladie de Parkinson et des synucléinopathies.....	page 18
<u>II. La protéine alpha-synucléine</u>	page 22
1. L’hypothèse de Braak.....	page 22
2. La forme physiologique de l’alpha-synucléine.....	page 25
3. La protéine alpha-synucléine sous sa forme pathologique :	page 28
a) Changement de conformation de l’alpha-synucléine.....	page 28
b) Protéine chaperonne.....	page 30
c) L’alpha-synucléine et la régulation des vésicules synaptiques et des neurotransmetteurs.....	page 30
d) Le système dopaminergique.....	page 31
e) La phosphorylation de l’alpha-synucléine en sérine 129.....	page 33
f) La nitration et le stress oxydatif	page 34
g) La résistance à la digestion par les protéases.....	page 34
h) Le système mitochondrial.....	page 35
i) Influence du pH et de la température.....	page 36

j) Le dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome.....page 37

III. La maladie de Parkinson et les pesticides.....page 39

1. Découverte d'un lien possible entre une substance chimique et la maladie de Parkinsonpage 39
2. Le MPTP.....page 39
3. Le paraquat.....page 40
4. Lien entre la maladie de Parkinson et le paraquat.....page 42

IV. Modèles animaux d'étude des synucléinopathies.....page 43

1. Modèles transgéniques, surexpression de l'alpha-synucléine par transgénèse ...page 43
2. Modèle d'inoculation d'une substance chimique (MPTP-Paraquat-Paraquat+Maneb)page 45
3. Modèle d'inoculation d'adéno-virus.....page 46
4. Modèle d'inoculation de fibrilles d'alpha-synucléine et d'agrégats.....page 47

Matériel et méthodes.....page 49

1. Collecte des échantillons biologiques.....page 51
2. Principes généraux à l'histologie et à l'immunohistochimie.....page 51
 - a) Inclusion en paraffine.....page 51
 - b) Mise en bloc.....page 52
 - c) Réalisation des coupes tissulaires.....page 52
 - d) Immunohistochimie (IHC).....page 53
3. Critère d'analyse de l'étude.....page 55
4. Analyse d'image à l'aide logiciel Fiji.....page 58

Résultats

Le modèle de souris transgéniques M83 : étude de la pathologie spontanée au cours du vieillissement ou accélérée par inoculation d'alpha-synucléine agrégée.....page 60

- I. Modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine lors du vieillissement chez la souris M83page 60
 - a. Phosphorylation sur la sérine 129 de l'alpha-synucléine.....page 60
 - i. Localisation de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129.....page 61
 - ii. Spécificité de détection des immunomarquages de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129.....page 63
 - iii. Evaluation des immunomarquages en fonction de l'âge et de la pathologie chez la souris M83.....page 65
 - b. Résistance de l'alpha-synucléine phosphorylée à la protéinase K.... page 68
 - c. Recherche de modifications post-traductionnelles par nitration...page 70
- II. Pathologie chez la souris M83 après injection d'un extrait cérébral de souris M83 malade.....page 72
- III. Pathologie chez la souris M83 après injection d'un produit d'amplification *in vitro* de l'alpha-synucléine agrégéepage 76
- IV. Recherche de modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine chez la souris M83 après exposition chronique au paraquat.....page 78
 - a. Recherche de la phosphorylation en sérine 129.....page 78
 - b. La résistance à la protéinase K des immunomarquages d'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129.....page 81

- c. Recherche de modifications post-traductionnelles par nitration protéique.....page 85
- V. Recherches de modifications post-traductionnelles de l’alpha-synucléine humaine mutée A53T exprimée à l’aide par un vecteur viral adéno-associé.....page 86

Discussion.....page 90

- I. Evolution des caractéristiques immunohistochimiques de l’alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez les souris M83.....page 90
 - 1. Localisation neuro-anatomique et sub-cellulaire de l’alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 au cours du vieillissement.....page 90
 - a. Immunomarquages de localisation nucléaire ou périnucléaire.....page 90
 - b. Immunomarquages intra-cytoplasmiques et des neurites.....page 92
 - 2. Localisation neuro-anatomique et sub-cellulaire de l’alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 inoculée par des extraits cérébraux de souris M83.page 92
 - 3. Localisation neuro-anatomique et sub-cellulaire de l’alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 exposée au paraquatpage 93
- II. Caractérisation de la résistance à la protéinase K de l’alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 détectée par immunohistochimie chez la souris M83.....page 94
- III. Essais de détection de protéines nitrées chez la souris M83.....page 95
 - 1. A l’aide d’anticorps dirigés contre la 3 nitro-tyrosinepage 96
 - 2. A l’aide d’anticorps spécifique de l’alpha-synucléine nitrée.....page 96
- IV. Caractéristiques immunohistochimiques de l’alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris C57Bl6 (KO alpha-synucléine murine) inoculée par un virus adéno-associé (AAV) permettant l’expression de l’alpha-synucléine humaine A53T....page 97

Conclusion.....page 100

Liste des abréviations :

AA : Acide aminé

AAV : Adéno-virus

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine

DLC : Démence à corps de Lewy

CA2 : Corne d'Ammon 2

CSP-alpha : Cysteine string protein alpha

HRP : Horseradish peroxidase

IC : Intra-cérébral

ICV : Intra-cérébro-ventriculaire

IHC : Immunohistochimie

IP : Intra-péritonéal

IV : Intra-veineuse

MB : Manèbe

MP : Maladie de Parkinson

MPP+ : 1-méthyl-4-phényl pyridinium

MPTP : 1-méthyle-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydro pyridine

MSA : Atrophie multi-systématisée

MSA-C : Atrophie multi-systématisée cérébreuse

MSA-P : Atrophie multi-systématisée parkinson

NAC : Non Amyloid Component

NT : Non traité

PMCA : méthode d'amplification cyclique des protéines

PQ : Paraquat

PK : Protéinase K

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein receptor, protéines transmembranaires

SNCA : Gène alpha-synucléine

TBS : Solution tamponnée au Tris

Illustrations

Figure 1 : Patient parkinsonien avec une posture voûtée. D'après The history of Parkinson's disease de Christopher Goetz

Figure 2 : Caractérisation des immunomarquages dans la maladie de Parkinson, d'après Anne-Laure Mougnot

Figure 3 : Les différents stades de l'hypothèse de Braak d'après Fulvio Lauretani

Figure 4 : Représentation du gène SNCA (a), de son ARNm (b) et de la séquence protéique de l'alpha-synucléine (c)

Figure 5 : Représentation immunohistochimique d'un corps de Lewy

Figure 6 : Différents stades d'agrégation de l'alphasynucléine (10)

Figure 7 : Schéma du fonctionnement vésiculaire entre deux synapses. D'après Marlène FOUCHEY (La synapse : transmission chimique)

Figure 8 : Synthèse de la dopamine

Figure 9 : Le fonctionnement des neurones dopaminergiques d'après Jean-Pierre Ternaux et Constance Hammond

Figure 10 : Nitration de la tyrosine

Figure 11 : Représentation d'une cellule neuronale saine et d'une cellule neuronale d'un parkinsonien. D'après Carroll Rutherford Fields dans Molecular Neuroscience

Figure 12 : Structures chimiques comparées du paraquat (PQ), du MPTP et du MPP+

Figure 13 : Souris TgM83 symptomatique à un stade sévère lié à sa pathologie au stade terminal

Figure 14 : Principe de précipitation du DAB en immunohistochimie

Figure 15 : Zone d'étude du modèle M83

Figure 16 : Localisation de l'alphasynucléine phosphorylée en sérine 129 dans le cerveau d'une souris M83 symptomatique âgée de 1 an.

Figure 17 : Comparaison de la détectabilité de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 avec trois anticorps monoclonaux de lapin dans le tronc cérébral de la souris M83 paralysée du train arrière

Figure 18: Détection de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 pathologique (Abcam Ab51253) chez la souris M83 au niveau du tronc cérébral et à des âges différents. Barre d'échelle = 50µm

Figure 19 : Critères de caractérisation lésionnelle chez la souris M83 par identification de la localisation sub-cellulaire des immunomarquages

Figure 20 : Mise en évidence de la résistance à la protéinase K de l'alpha-synucléine phosphorylée dans le tronc cérébral de la souris M83 paralysée du train arrière

Figure 21 : Essai de détection de l'alpha-synucléine nitrée en tyrosine 39 par l'anticorps nSyn14 (Merck) par immunohistochimie dans le tronc cérébral et le cervelet de la souris M83

Figure 22 : Essai de détection de formes nitrées totales dans le tronc cérébral et le cervelet chez la souris M83

Figure 23 : Distribution de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 homozygote ou hémizygote pour l'alpha-synucléine après une inoculation d'extrait cérébral de souris M83 malade par voie intra-cérébroventriculaire.

Figure 24 : Distribution de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 homozygote ou hémizygote après une inoculation d'extrait cérébral de souris M83 malade par voie intra-péritonéale

Figure 25 : Distribution de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 inoculée par voie intra-striatale par un produit d'amplification in vitro de cerveau de souris M83

Figure 26 : Comparaison des immunomarquages et localisation de l'alpha-synucléine phosphorylée dans le cerveau de souris M83 inoculées par différentes stratégies expérimentales

Figure 27 : Caractérisation de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 détectée par immunohistochimie chez la souris M83 exposée par voie orale à un herbicide, le paraquat.

Figure 28 : Représentation graphique du nombre d'évènements correspondants aux immunomarquages d'alpha-synucléine phosphorylée dans trois régions cérébrales de souris M83 exposées ou non au paraquat.

Figure 29 : Caractérisation de la résistance à la protéinase K de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 détectée par immunohistochimie chez la souris M83 exposée par voie orale à un herbicide, le paraquat

Figure 30 : Représentation graphique du nombre d'évènements correspondants aux immunomarquages d'alpha-synucléine phosphorylée dans trois régions cérébrales de souris M83 exposées (points rouge) ou non (points verts) au paraquat

Figure 31 : Comparaison des ratios des évènements correspondants aux immunomarquages d'alpha-synucléine phosphorylée observés sur les coupes traitées/non traitées par la protéinase K.

Figure 32 : Essai de détection de l'alpha-synucléine nitrée en tyrosine 39 par l'anticorps nSyn14 (Merck) et de la 3-Nitrotyrosine par immunohistochimie dans le tronc cérébral et le cervelet de la souris M83 exposé au paraquat par eau de boisson

Figure 33 : Représentation schématique de la distribution d'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 dans le cerveau d'une souris C57Bl/6 (KO alpha-synucléine murine) inoculée par voie intra cérébro-ventriculaire à la naissance par un virus adéno-associé (AAV) permettant l'expression de l'alpha-synucléine humaine A53T

Figure 34 : Distribution de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 (Ab51253) chez la souris C57Bl6 KO inoculé en intra-cérébroventriculaire par des AAV alpha-synucléine A53T.

Tableaux

Tableau 1 : Tableau des lignées d'animaux utilisées dans cette étude et leurs caractéristiques correspondantes

Tableau 2 : Liste des produits utilisées lors de nos protocoles de manipulations en immunohistochimie

Introduction

I. Les synucléinopathies

Les synucléinopathies sont des maladies neurodégénératives dont les lésions sont caractérisées par la présence d'une protéine, l'alpha-synucléine, sous une forme pathologique.

Les synucléinopathies, regroupent entre autres la maladie de Parkinson mais également la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée.

1. La maladie de Parkinson (MP)

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer. Elle est diagnostiquée en moyenne vers l'âge de 58 ans et atteint environ 6,3 millions de personnes dans le monde, dont 100 000 à 120 000 patients en France (<https://www.franceparkinson.fr/la-maladie/presentation-maladie-parkinson/>). Cette

pathologie est en constante augmentation et l'implication d'interactions entre des facteurs génétiques et environnementaux, incluant l'exposition à des pesticides, rend complexe la compréhension de l'origine et des mécanismes de la maladie.

Les patients atteints de MP présentent sur le plan clinique des symptômes dont certains sont relativement spécifiques, résultant d'un déficit en dopamine lié à l'atteinte de la substance noire et des neurones dopaminergiques. (Charcot, Leçon sur les maladies du système nerveux) (29), (16) (46)

a. Troubles précoces de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson a toujours été vue comme une maladie uniquement motrice or les troubles précoces ne sont pas du tout moteur. Les troubles du sommeil, la constipation et les déficits olfactifs sont des signes auquel il faut être attentif car ils sont un signe de la pathologie. Le patient est souvent atteint d'insomnie, il présente des contractions des muscles involontaires pendant la nuit. Pendant leur sommeil, ces personnes font souvent des gestes, des sons involontaires qui peuvent être très violents pour lui et pour leur compagne/compagnon.

Certains patients perdent le goût des aliments et l'odorat, ce symptôme varie d'un patient à l'autre, la gravité et le temps d'évolution n'est jamais identique. (18) La constipation est aussi un des symptômes non moteurs reconnu comme signe précoce. (16) (46)

b. Tremblement au repos

C'est l'un des symptômes les plus caractéristiques de la maladie. Le patient présente ces tremblements lorsque son corps est totalement au repos mais ils disparaissent lorsqu'il réalise un mouvement. Il est à noter que les états émotionnel et mental du patient peuvent avoir un effet positif ou négatif sur ces symptômes. Ces tremblements sont majoritairement observés au niveau des membres supérieurs. (13) (29), (16) (46)

c. Akinésie (lenteur des mouvements)

Elle se définit par une lenteur du mouvement lors de son initiation. Elle est souvent associée à la bradykinésie qui est la diminution de la vitesse du mouvement et à l'hypokinésie définie par la diminution de l'amplitude du mouvement, avec des difficultés lors de la marche, de la déglutition, de la prise de parole ou de la répétition de certains gestes simples. (13) (29), (16) (46)

d. Rigidité (posture voûtée)

Le patient présente des raideurs dans certains muscles qui sont observables lors de la réalisation de plusieurs mouvements avec difficulté. La raideur présente chez le patient parkinsonien entraîne une posture voûtée, le tronc incliné et la tête penchée vers l'avant. (Figure 1). Cette posture instable peut se révéler dangereuse car elle entraîne des pertes de l'équilibre et le patient risque de chuter. Les bras sont immobiles, ne se balancent pas le long du corps, la démarche est ralentie avec les pieds qui traînent, et de petits pas qui empêchent d'avoir une démarche coordonnée, pouvant entraîner des chutes. (28) (29)

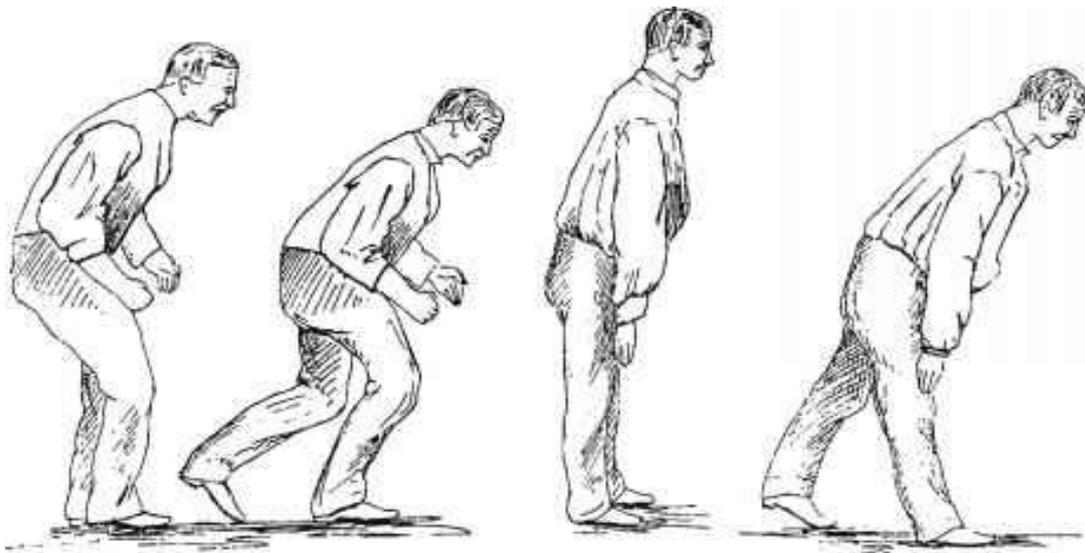


Figure 1: Patient parkinsonien avec une posture voûté.

D'après The history of Parkinson's disease de Christopher Goetz

e. Pertes de mémoire

Les pertes de mémoires sont significatives des maladies neurodégénératives de façon générale et peuvent être présentes dans la MP, en lien avec une atteinte de la région de l'hippocampe avec une destruction partielle de ses neurones qui sont essentiels pour la mémoire. Même si les déficits moteurs sont initialement prépondérants, la MP peut évoluer vers une démence au fil des années en relation avec une extension des lésions cérébrales. (46)

f. Changement de comportement

Chez de nombreux sujets, différents signes neuropsychiatriques, incluant des hallucinations, de la dépression, de l'anxiété et des changements d'humeur rapides sont observés. Ces différentes observations entraînent d'autres symptômes liés à ces états, avec des troubles de l'appétit, un sentiment de tristesse ou d'absence de confiance en soi, qui peut se refléter sur le visage, souvent figé, de certains patients, qui paraissent absents et ne pas traduire d'émotion. Cet état dépressif s'intensifie, ce qui induit une hausse du taux de décès non suicidaire, et engendre en tout cas une diminution significative de la qualité de vie des patients et des personnes qui l'entourent. (46) (16)

2. L'histoire de la maladie de Parkinson et des synucléinopathies

L'histoire de la maladie de Parkinson a commencé très tôt dans l'Égypte antique avec des hypothèses sur une pathologie décrivant des tremblements.

En 1817, James Parkinson a décrit pour la première fois la maladie de Parkinson sous le nom de « paralysie agitante » dans sa publication « An essay on the shaking palsy » (60). L'auteur raconte aussi que Galien en l'an 175 avant J-C avait décrit ces observations, les symptômes d'un patient parkinsonien. (36) (60)

Il la définit comme des mouvements de tremblement involontaire associés à une diminution de la force musculaire survenant dans les parties du corps au repos (36) (60)

James Parkinson décrit les premiers symptômes de la maladie sur seulement 6 cas, dont les tremblements, la posture voûtée et les mouvements involontaires.

Ce n'est que des années plus tard que le neurologue français Jean-Martin Charcot mit en avant les travaux de James Parkinson et nomma cette pathologie maladie de Parkinson afin de lui rendre hommage.

En 1868, Jean-Martin Charcot est le directeur de thèse de Leopold Ordenstein qui publie une thèse « Sur la paralysie agitante et la sclérose en plaque généralisée » (55) où ils ont redéfini les caractéristiques de cette maladie et ses symptômes ; ils évoquaient aussi le terme de névrose.

Il faudra attendre plus de vingt ans pour que Jean-Baptiste Charcot, Georges Marinesco et Paul Oscar Blocq découvrent un lien direct qui impliquerait le système nerveux central dans la maladie de Parkinson. Blocq évoquera cette hypothèse lors d'une conférence à la Salpêtrière en 1893 et mit en avant leur découverte sur cette pathologie en écrivant un article. (8)

Aujourd'hui encore, l'origine de la maladie reste mal comprise mais sa symptomatologie et sa progression sont en revanche très largement expliquées dans la littérature scientifique ; le suivi

des patients et la gestion de la maladie sont très développés et très bien gérés par les spécialistes qui traitent la maladie. Certain traitement comme la L-Dopamine permet d'améliorer certains symptômes moteurs et une opération qui consiste à mettre des électrodes dans le cerveau pour remplacer le traitement de la L-Dopa. (71) Il n'y a pas traitement spécifique qui peut guérir la maladie pour l'instant mais il existe des exercices physiques ou oraux qui peuvent être mis en place par un orthophoniste pour stimuler le système nerveux. (<https://www.franceparkinson.fr/la-maladie/traitements/>)

Le diagnostic est essentiellement clinique car il n'existe pas de test biologique validé pour permettre le diagnostic confirmé durant la vie du sujet, qui peut être obtenu après l'autopsie du patient en recherchant la déperdition de neurones dopaminergiques présents dans la substance noire et les lésions cellulaires qui l'accompagnent. Cet examen *post mortem* est essentiel pour déterminer précisément la nature de la maladie dont est atteint le patient. (5) A l'examen neuropathologique, la maladie de Parkinson est caractérisée par la présence de corps d'inclusion intracellulaires, appelés corps de Lewy, et des dépôts dans les prolongements neuronaux appelés neurites de Lewy. (Figure 2) Au sein de ces lésions la protéine alpha-synucléine se présente sous une forme agrégée.

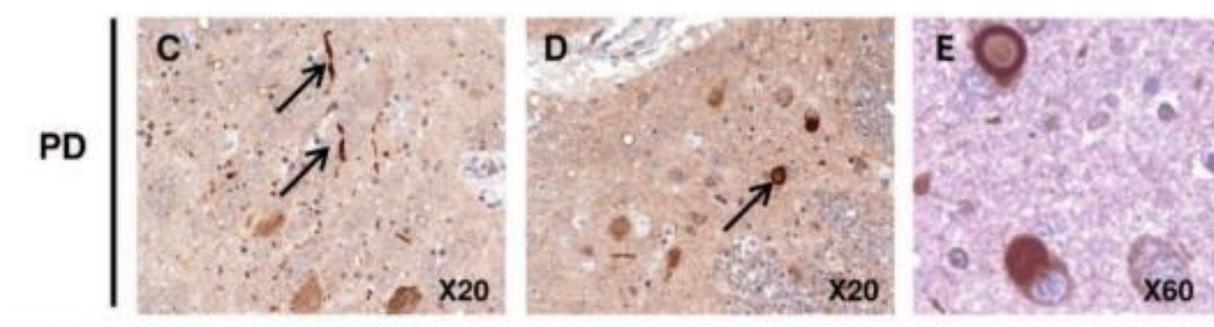


Figure 2: Caractérisation des immunomarquages dans la maladie de Parkinson, d'après Anne-Laure Mougenot

(C) neurites de Lewy, (D) inclusions d'alpha-synucléine, (E) corps de Lewy

Le système nigostrié est touché dans cette pathologie, il est défini par le corps cellulaire au niveau de la substance noire qui se projette dans le striatum, c'est le lieu de contrôle de

l'initiation des mouvements volontaires. Cette maladie est représentée par la perte des neurones dopaminergique dans la substance noire et un déficit en dopamine dans le striatum. Cette observation explique la symptomologie des patients parkinsonien et l'utilisation d'un traitement par l'ajout de L-Dopa chez ces personnes. (Traitement de la maladie de Parkinson, <https://www.franceparkinson.fr/la-maladie/traitements/>)

Ces mêmes lésions cellulaires sont aussi retrouvées dans la démence à corps de Lewy (DLC), mais la distribution de ces corps et neurites de Lewy est alors davantage située dans les régions plus frontales du cerveau, plus particulièrement le cortex cérébral et l'hippocampe.

Cette autre maladie, qui est aussi une synucléinopathie, se caractérise par une symptomatologie qui peut évoquer à la fois la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Elle reste encore méconnue et peu diagnostiquée à cause de sa ressemblance importante avec ces deux pathologies. Elle se manifeste par des troubles de l'attention, une perte progressive de la perception visuelle, spatiale (le lieu) mais les principaux symptômes qui la différencie des autres synucléinopathies sont des hallucinations, des déficits cognitifs fluctuants et des troubles du sommeil. (31) (Maladie à corps de Lewy diffus : diagnostic différentiel Dr Thibaud Lebouvier, <https://www.e-ma2.fr/wp-content/uploads/sites/2/2018/08/18-S5-11-Lebouvier-1.pdf>) Cette maladie affecte en effet à la fois les parties antérieures du cerveau qui gèrent les fonctions cognitives et les parties plus profondes et postérieures (système nigro-strié) qui gèrent le contrôle des mouvements. (Maladie à corps de Lewy diffus : diagnostic différentiel Dr Thibaud Lebouvier, <https://www.e-ma2.fr/wp-content/uploads/sites/2/2018/08/18-S5-11-Lebouvier-1.pdf>) La maladie de Parkinson peut en quelques années évoluer vers une maladie de Parkinson avec démence, il y a un continuum entre les deux pathologies mais la différence est dans la démence à corps de Lewy, les troubles cognitifs sont plus précoces que dans les autres maladies neurodégénératives. La survenue plus précoce d'une atteinte corticale dans la

DLC la différencie de la maladie de Parkinson avec démence et une atteinte minime du tronc cérébral. (17)

La présence de corps et neurites de Lewy dans les neurones atteints, contenant l'alpha-synucléine sous forme agrégée, ainsi que de l'ubiquitine, correspond, comme pour la MP, à la définition lésionnelle de la maladie. (24)

L'atrophie multisystématisée (MSA) est une troisième synucléinopathie caractérisée de façon remarquable par la présence de lésions gliales appelées inclusions cytoplasmiques oligodendrogiales. (32) (33) (58). Cette pathologie est causée par une perte progressive de neurones dans différentes régions du cerveau. Les symptômes définissant cette pathologie qui touche la personne à l'âge adulte sont, de façon très variable selon les patients, outre les tremblements, la lenteur des mouvements et la rigidité (syndrome parkinsonien), une ataxie (déséquilibre) ainsi qu'une hypotension orthostatique (chute de la pression artérielle), des troubles génito-urinaires. (32) (33) (58). Il existe deux formes de MSA, la forme C (cérébreuse), elle touche les zones cérébelleuses et provoque les symptômes de tremblement et de posture instable. La MSA-P (Parkinson) dont 80% patients atteints de la MSA ont cette forme, elle ressemble à la maladie de Parkinson avec les signes de tremblements au repos, une lenteur des mouvements et la rigidité. (58)

On estime en France qu'une personne sur 10 000 à 1 personne sur 50 000 est touchée par la maladie. Contrairement aux autres synucléinopathies, son diagnostic est très difficile pour cette maladie ; l'âge de survenue est compris entre 50 et 70 ans et elle touche davantage les hommes que les femmes. (3)

Dans notre étude expérimentale réalisée dans différents modèles de souris, nous allons nous intéresser spécifiquement aux modifications post-traductionnelles associées à l'agrégation de la protéine alpha-synucléine, qui sont présentes dans les lésions tissulaires qui viennent d'être évoquées.

II. La protéine alpha-synucléine

Les synucléinopathies sont caractérisées par l'agrégation de la protéine alpha-synucléine dans le système nerveux central et/ou périphérique, conduisant à la formation des corps et neurites de Lewy dans les régions cérébrales lésées. L'équipe scientifique de Richard Scheller est la première à expliquer que l'alphasynucléine est une protéine neuronale de 140 acides aminés. Elle est localisée dans les terminaisons synaptiques et dans les noyaux neuronaux, l'origine de son nom vient de cette description « syn » pour synapse et « nuclein » pour noyau. (45)

Il existe une ressemblance entre certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et les maladies à prions portant sur un mécanisme appelé « Prion-Like ».

Ce mécanisme est défini par la capacité de la protéine à modifier sa conformation, peut engendrer une propagation de la cellule anormale à une cellule saine et à s'auto-agréger. (10)

Ces mécanismes participent, en l'état actuel des connaissances uniquement pour les maladies à prion, à la possible transmissibilité de la maladie entre individus, tandis qu'ils pourraient contribuer à expliquer l'extension des lésions chez les patients atteints lors de la progression de la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer.

1. L'hypothèse de Braak

Braak a ainsi émis l'hypothèse que « l'évolution de la maladie de Parkinson se ferait grâce à un mécanisme « prion-like » (49) (9), (10) qui débiterait dans le bulbe olfactif ou/et le système nerveux entérique, qui pourraient représenter des sites anatomiques initiaux de l'agrégation de la protéine avant que celle-ci ne se propage par exemple via le nerf vague vers le tronc cérébral puis la substance noire. La destruction des neurones dopaminergiques est importante, voire quasi-totale, dans cette dernière zone lorsqu'apparaissent les signes cliniques caractéristiques de la MP. Cette destruction et le déficit de dopamine qui en résulte expliquent ainsi l'apparition de nombreux symptômes tels que les tremblements ou la rigidité musculaire. L'hypothèse de Braak fait cependant écho au fait que, des années avant ces signes caractéristiques de la maladie,

le patient présente fréquemment un déficit olfactif ou des troubles gastro-intestinaux comme la constipation. (9)

L'hypothèse de Braak est basée sur la même approche que sur la maladie du prion où il a été démontré une atteinte du système nerveux périphérique à l'origine de la propagation de ces agents pathogènes vers le cerveau et le système nerveux central. (47)

Une étude expérimentale récente chez la souris conforte cette hypothèse, des chercheurs de Baltimore ont injecté des agrégats d'alpha-synucléine d'origine recombinante chez la souris C57Bl/6 au niveau du duodénum et du pylore. (61) L'agrégation de l'alpha-synucléine a été ensuite observée au niveau des noyaux moteurs dorsaux du nerf vague puis la région de l'amygdale dans le cerveau jusqu'au cortex comme le proposait Braak dans son hypothèse. Progressivement, les animaux ont présenté des symptômes identiques à ceux de la maladie de Parkinson, des signes gastro-intestinaux qui correspondent aux signes précoces de la pathologie puis des signes moteurs. L'atteinte du cerveau survient au bout de 10mois après l'atteinte du système gastro intestinal. (61)

D'autres études ont alors été réalisées sur des greffes de neurones dans des modèles Parkinsonien, le but était de voir si les greffons pouvaient devenir pathogène à cause de l'alphasynucléine pathologique déjà présente. Un traitement immunosuppresseur a été donné pendant 6 mois après la greffe. La première étude explique qu'aucune inclusion anormale n'a été observé dans les cellules greffées chez les 5 patients. (48) La deuxième étude a une méthode de greffe différente qui a sûrement dû avoir un effet sur la greffe car la présence de signe de dégénérescence a été observée dans ce travail. (40) Ces travaux montrent que la greffe, même si elle n'empêche pas l'apparition de symptômes, peut amener un meilleur confort de vie, le

risque de dégénérescence restant quand même important dans ces pathologies déjà présente chez le patient.

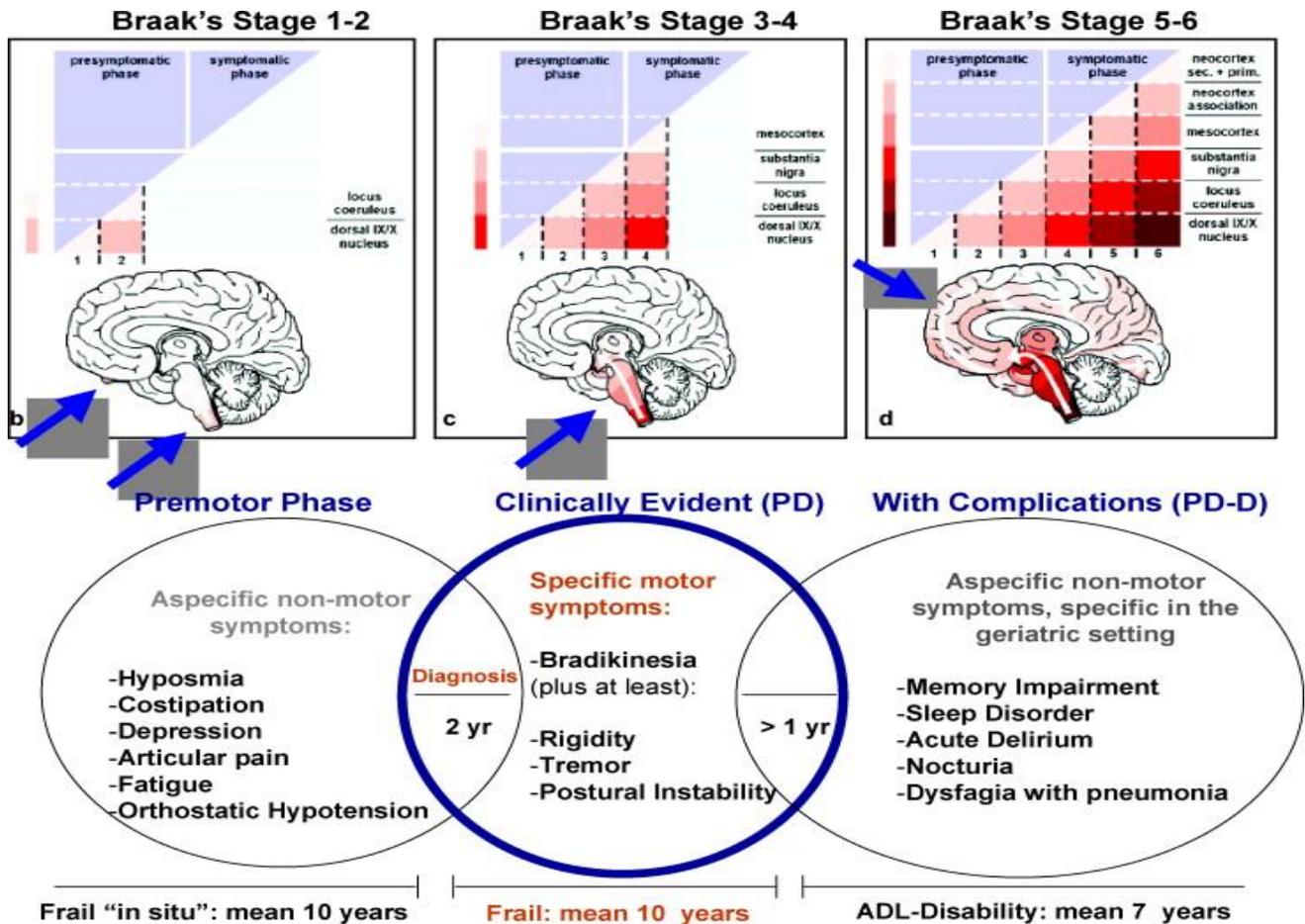


Figure 3 : Les différents stades de l'hypothèse de Braak d'après Fulvio Lauretani

Outre l'hypothèse de Braak qui pourrait éventuellement impliquer l'infection par un agent pathogène qui atteindrait le système entérique par la voie orale ou/et le système nerveux central par le nerf olfactif, d'autres hypothèses mécanistiques sont essentielles comme la connaissance de prédispositions génétiques, les interactions avec des facteurs environnementaux (pesticides, contaminant chimiques, médicaments) qui provoquent par exemple un stress oxydatif, tels que oxydation ou nitration (paraquat) ou une atteinte mitochondriale (roténone), ou même une neuroinflammation du système nerveux central qui joue un rôle important dans la progression des lésions.

La phase pré-motrice aussi appelé la phase précoce est l'étape où le patient est atteint de symptômes non moteur comme la constipation, les déficits olfactifs, la fatigue et les troubles du sommeil. Cette étape correspond au stade 1 et 2 de Braak, elle peut durer 10 ans avec une atteinte située dans la moelle épinière au niveau des vertèbres thoraciques. (figure 3) (9)

La phase clinique avec des symptômes moteurs commence deux ans après le diagnostic de la pathologie. Les symptômes sont la bradykinésie, la rigidité et la posture instable qui peut durer une dizaine d'année. L'atteinte de la maladie est de plus en plus grande dans le cerveau, les régions touchées sont la moelle épinière, le tronc cérébral, la substance noire et une partie du cortex. Cette phase est nommée la phase 3-4 de Braak. (figure 3) (9)

Le dernier stade est le plus critique avec des complications importantes de la pathologie, les patients ont des symptômes très handicapant tels que la perte de mémoire, démence. Les régions les plus touchées sont le cortex dans sa totalité, très fortement le tronc et la substance noire, ce stade dure 7 ans et correspond aux étapes 5 et 6 de Braak. (Figure 3) (9)

2. Forme physiologique de l'alpha-synucléine

L'alpha-synucléine est une protéine ubiquitaire de 140 acides aminés (aa) qui appartient à la famille des protéines synucléines. Elle est très abondante dans le cerveau humain, mais est aussi présente dans divers tissus comme le cœur, les intestins, les muscles. Au cours de l'embryogénèse, l'alpha-synucléine est présente dans le corps cellulaire des neurones puis à l'âge adulte, elle est retrouvée au niveau des extrémités des cellules nerveuses appelées terminaisons présynaptiques.

Physiologiquement à l'état monomérique, elle est structurée sous forme d'hélices alpha lorsqu'elle s'associe à des phospholipides membranaires ou sous forme dépliée présente dans le cytosol des cellules. Ces différentes formes permettent à la protéine d'interagir avec les

membranes plasmiques des organites comme les vésicules présynaptiques pour réguler le transport des neurotransmetteurs (56)

Cette protéine est majoritairement présente dans les neurones et à une fonction de chaperon pour permettre le relargage des neurotransmetteurs au niveau de la synapse, réguler le taux de dopamine et a un rôle neuroprotecteur sous sa forme physiologique.

L'alpha-synucléine n'est pas l'unique protéine présente dans la famille des synucléines : il existe aussi la bêta-synucléine et la gamma-synucléine. Toutes ces protéines sont codées par des gènes localisés sur des chromosomes différents. Le gène SNCA qui code l'alpha-synucléine est situé sur le chromosome 4 chez l'homme. (68) Ce gène, qui est constitué de 6 exons dont 5 correspondent à la région codante de l'alpha-synucléine, est fortement conservé, avec seulement quelques acides aminés différents entre les espèces. (Figure 4)

La protéine présente trois régions très distinctes : (Figure 4) (68)

- Une région N-terminale dite amphiphile (une partie hydrophile et une partie hydrophobe) contenant une quantité importante d'acides aminés basiques, chargés positivement. (Figure 4) Il existe dans cette partie une répétition imparfaite de 6 domaines avec un motif KTKEGV très conservé, à l'origine de l'organisation en hélices alpha de la protéine. Cette région lie l'alpha-synucléine aux lipides grâce à une courte séquence qui coupe les hélices alpha et permet la liaison de la protéine avec les vésicules présynaptiques. Ce domaine peut présenter notamment trois mutations majeures A30P, A53T et E46K, qui sont observées dans des formes génétiques rares de la maladie de Parkinson. (56) (68)
- Une région centrale appelé NAC (Non Amyloid Component) comprise entre les acides aminés 61 à 95. (Figure 4) Cette région est aussi retrouvée dans des fibres ayant une action délétère chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ce domaine est le site de l'auto-agrégation de la protéine et est à l'origine de la formation de fibrilles

d'alpha-synucléine. Cette région peut aussi former des structures en feuillets bêta non réversibles, les feuillets bêta ne peuvent pas se dissocier ce qui empêche la protéine de revenir à une forme monomérique. La protéine devient pathologique sous cette forme de feuillet bêta.

(56) (68)

- Une région C-terminale où un motif constitué de 31 acides aminés joue un rôle dans le contrôle de l'agrégation et la fibrillation de la protéine. (Figure 4) Elle permet l'interaction avec d'autres protéines et est le lieu de modifications post-traductionnelles. Cette région contient ainsi plusieurs sites potentiels de phosphorylation (Y125, S129, Y133 et Y135) dont la plus caractérisée est celle de de la sérine 129, du fait de son lien majeur avec la pathologie humaine. (56) Ce domaine est aussi le site d'autres modifications post-traductionnelles telle que la nitration. Cette région est essentielle dans le rôle de chaperon de la protéine et son rôle neuroprotecteur. (68) (10) (70)

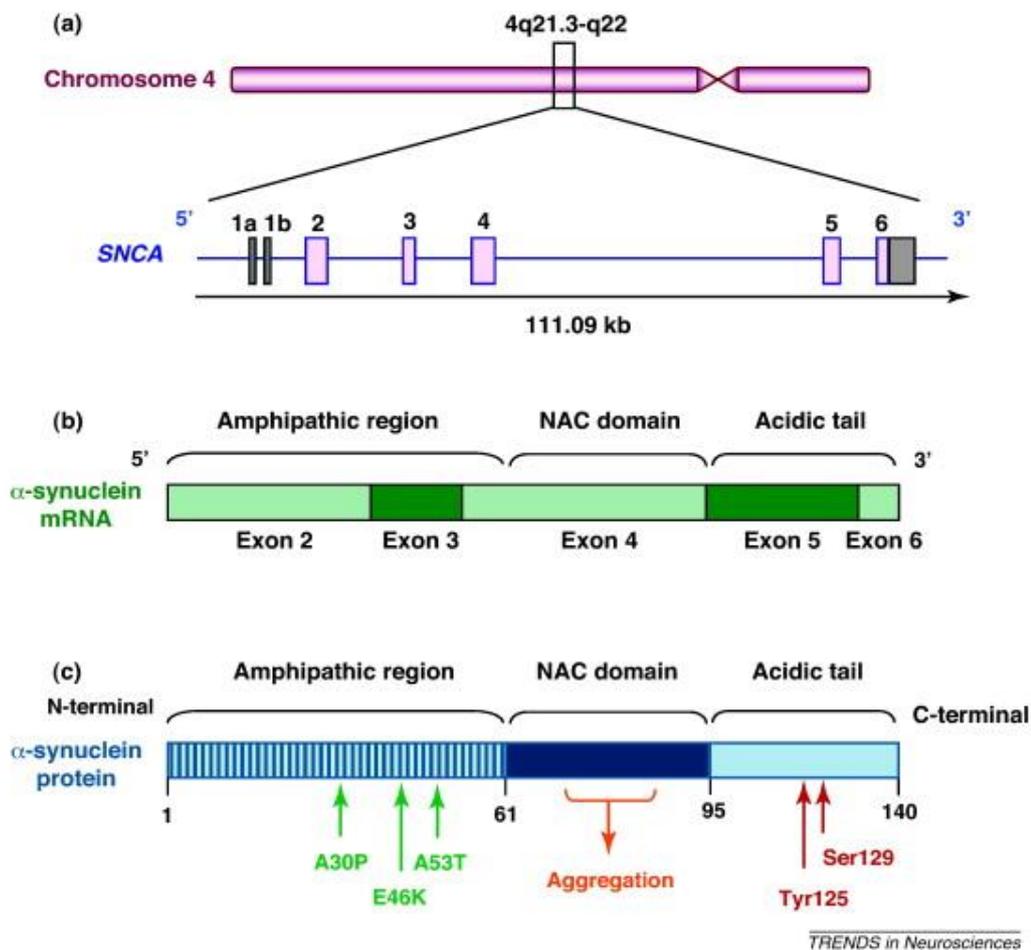


Figure 4: Représentation du gène SNCA (a), de son ARNm (b) et de la séquence protéique de l'alphasynucléine (c)

3. La protéine alpha-synucléine sous sa forme pathologique :

Parmi les mécanismes qui caractérisent le développement de la maladie de Parkinson, on retrouve le stress oxydatif, le dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome, l'atteinte du système mitochondrial avec un défaut de la chaîne respiratoire et l'agrégation de l'alpha-synucléine en lien avec des modifications post-traductionnelles.

a) Changement de conformation de l'alpha-synucléine

L'alpha-synucléine non pathologique est une protéine monomérique soluble. L'augmentation de la concentration de la protéine (duplication/triplication du gène) ou une mutation de ce gène, le stress oxydatif ou l'atteinte mitochondriale, par exemple en lien avec l'exposition à des

pesticides, sont associés à la MP au cours de laquelle un changement de conformation de la protéine est présent ; sa structure passera d'une hélice alpha à un feuillet bêta. (28) (10) Ce changement de conformation qui accompagne l'agrégation de la protéine, avec la formation de d'oligomères voire de fibres d'alpha-synucléine, conduit ainsi à la formation de corps et neurites de Lewy chez les patients. (Figure 5) (Figure 6) (20)

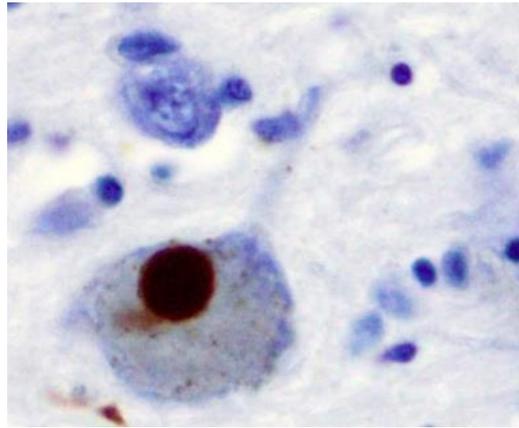


Figure 5 : Représentation immunohistochimique d'un corps de Lewy

La protéine se présente sous forme d'hélices alpha lorsqu'elle interagit avec des lipides membranaires ou est dépliée, sans structure propre, dans le cytosol. L'alpha-synucléine peut avoir différentes formes autres que la forme monomérique, elle peut se dimériser ou former des oligomères et fibrilles, toutes les étapes conduisant à ces formes de la protéine sont réversibles. (Figure 6) (14) Elle a une capacité qui lui permet de s'auto-assembler et d'obtenir ces différentes formes. L'alpha-synucléine pathologique peut voir sa forme changer, certains oligomères de faible poids moléculaire restent solubles alors que ceux de grand poids moléculaire deviennent insoluble et permettent la formation de fibrilles d'alpha-synucléine insoluble dû à plusieurs facteurs comme le stress oxydatif et les modifications post-traductionnelles. La formation de feuillet bêta est irréversible et la désorganisation de la protéine est systématique, l'alpha-synucléine perd alors son rôle de chaperon. (10) (70)

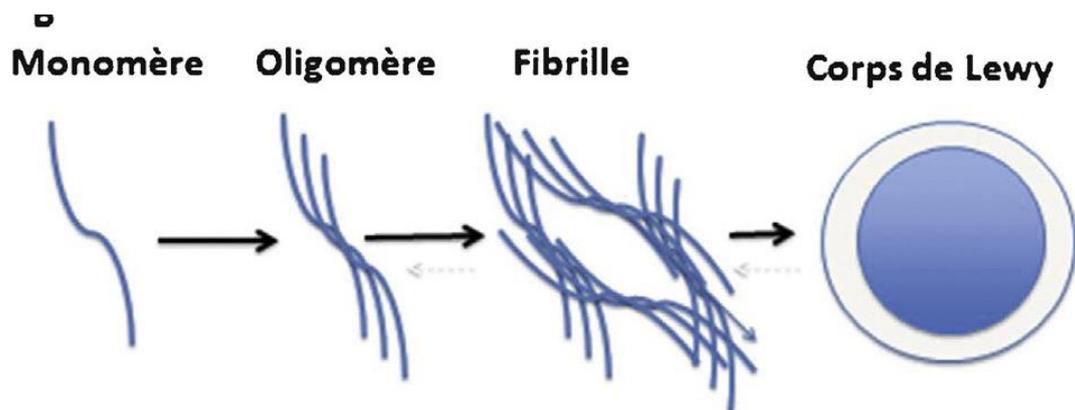


Figure 6 : Différents stades d'agrégation de l'alphasynucléine (10)

b) Protéine chaperonne

L'alpha-synucléine est une protéine chaperonne, à une action neuroprotectrice. (10) (70). C'est une protéine qui a une activité en lien avec les deux régions N- et C-terminales. La région N-terminale se lie au substrat des protéines pour former de gros complexes protéiques alors que la partie C-terminale est impliquée dans la solubilisation des différents domaines de la protéine. Or, si la protéine n'est plus soluble en relation avec sa présentation sous forme de feuillets bêta, la protéine perd la fonction de son motif C-terminal et perd son activité chaperonne de la protéine. (59) Cette activité est essentielle car elle protège l'alpha-synucléine de l'agrégation mais aussi de la dénaturation chimique. L'action chaperonne permet aussi la protection des cellules neuronales comme les cellules dopaminergiques, en régulant dans sa forme physiologique l'activité des neurotransmetteurs (la dopamine) qui assure la transmission des messages au niveau des synapses des neurones.

c) L'alpha-synucléine et la régulation des vésicules synaptiques et des neurotransmetteurs

Au niveau des terminaisons présynaptiques, il existe des vésicules synaptiques contenant des neurotransmetteurs qui sont libérés dans la fente synaptique par exocytose, cela grâce au rôle

de chaperon de la protéine qui consiste à réguler l'activité des neurotransmetteurs. L'exocytose est un système membranaire qui permet de relarguer du contenu cellulaire dans une autre cellule ou dans le milieu extracellulaire. (Figure 7) Pour réaliser une exocytose, il est nécessaire d'avoir un potentiel d'action qui va entraîner une dépolarisation puis l'ouverture des canaux calciques pour relarguer les neurotransmetteurs sur les récepteurs

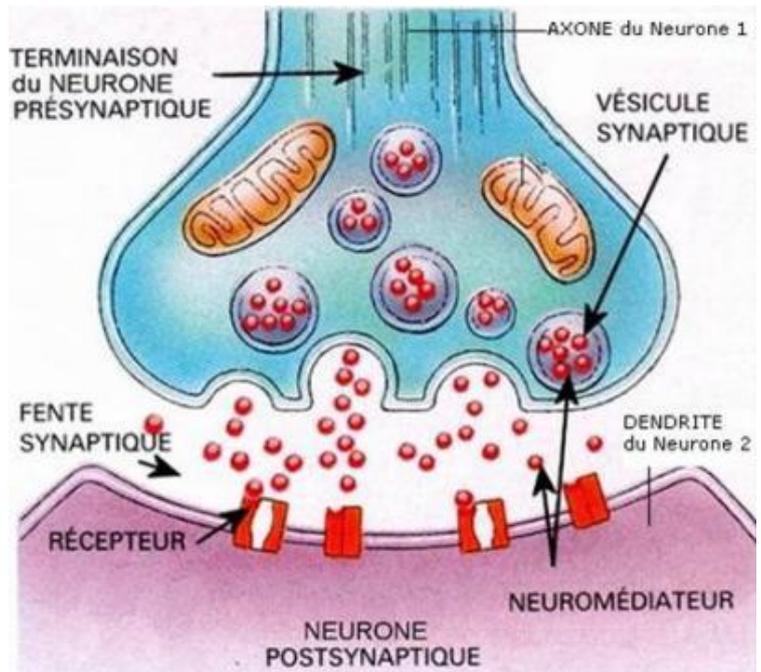


Figure 7: Schéma du fonctionnement vésiculaire entre deux synapses

D'après Marlène FOUCHÉY (*La synapse : transmission chimique*)

post-synaptiques. (Figure 7) Lorsque la synapse est au repos, la vésicule se trouve dans le pool de réserve en attendant l'activité du potentiel d'action.

L'alpha-synucléine a un rôle de chaperon dans le fonctionnement des vésicules au niveau des synapses. (11) Elle régule la quantité et la vitesse de recyclage des vésicules synaptiques et gère la fluctuation et la libération des neurotransmetteurs vers la zone présynaptique. Au niveau de la membrane présynaptique, elle va se lier à la protéine chaperonne CSP-alpha (cysteine string protein alpha) ce qui permet la liaison directe aux protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor) qui ont un rôle lors de la fusion des vésicules. L'analyse des fonctions de l'alpha-synucléine montre qu'elle possède une action sur les vésicules au niveau du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi mais aussi des synapses. (11)

d) Le système dopaminergique

La tyrosine hydroxylase est l'enzyme qui produit la dopamine au niveau de la substance noire. L'alpha-synucléine va réguler la production de cette dopamine en contrôlant l'action de la tyrosine hydroxylase.

La dopamine est synthétisée à partir de la L-tyrosine via une réaction impliquant la tyrosine hydroxylase et générant de manière réversible la L-Dopa qui sera décarboxylée en dopamine par la DOPA carboxylase. (Figure 8)

Lorsque la dopamine est formée, elle est chargée dans les vésicules synaptiques pour être transportée vers un autre neurone en tant que neurotransmetteur.

Lorsqu'il y a le potentiel d'action, la dopamine est libérée par exocytose dans le milieu extracellulaire entre les deux synapses. L'alpha-synucléine va réguler ce processus pour éviter une surcharge de la dopamine relarguée. (11) Cette sérine 40 est importante car elle active la tyrosine hydroxylase et la production de la dopamine, elle est phosphorylée par la protéine kinase PKA et déphosphorylée par la protéine phosphatase 2

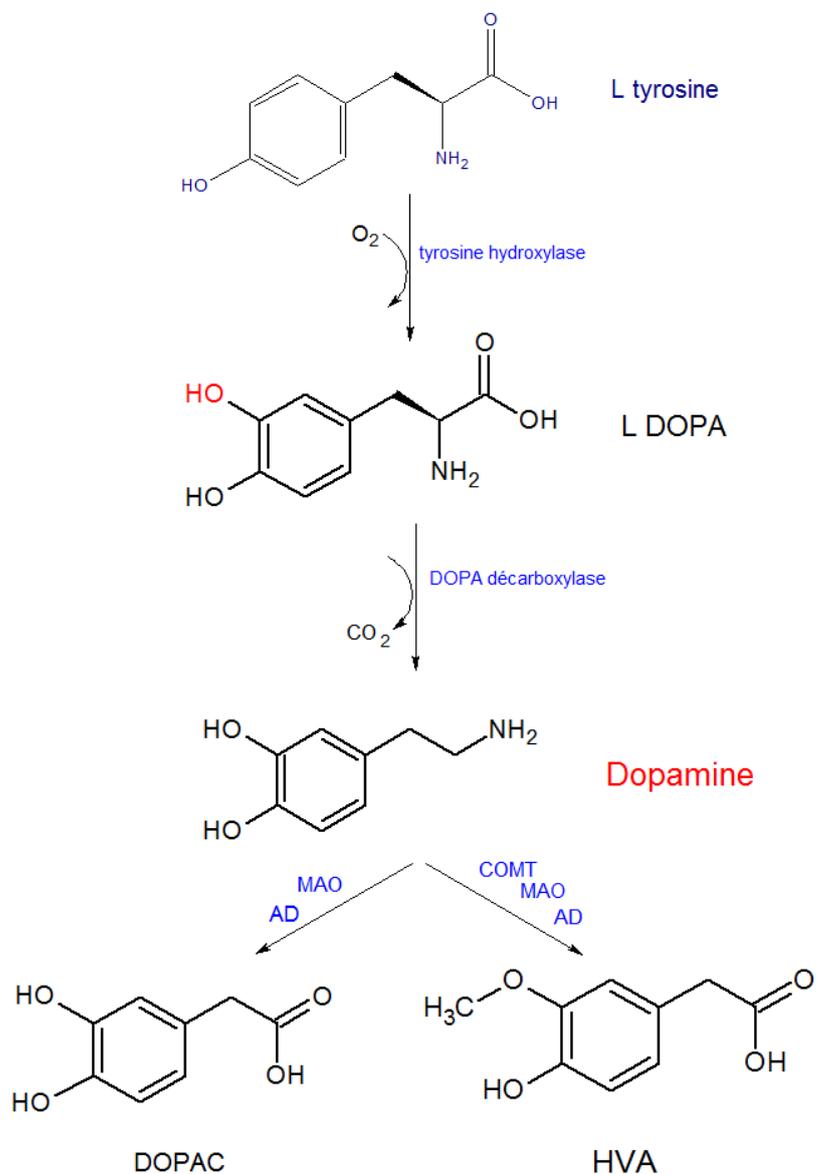


Figure 8: Synthèse de la dopamine

(PP2A). Cette protéine interagit ensuite avec l'alpha-synucléine et aura un effet inhibiteur sur la tyrosine hydroxylase pour éviter une production excessive de dopamine. (75) (Figure 9)

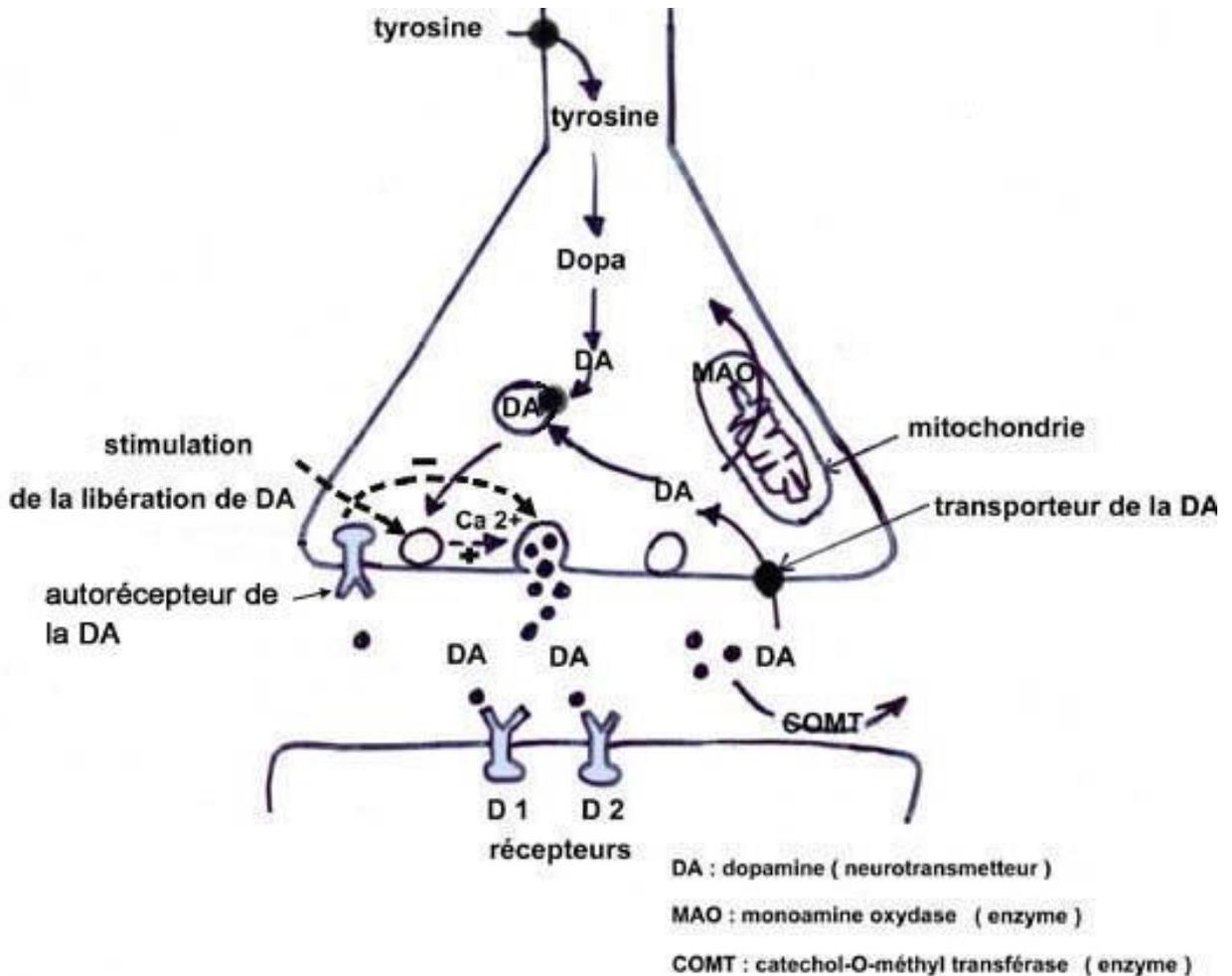


Figure 9: Le fonctionnement des neurones dopaminergiques d'après Jean-Pierre Ternaux et Constance Hammond

e) La phosphorylation de l'alpha-synucléine en sérine 129

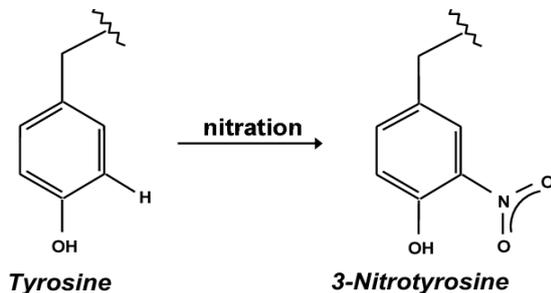
Une des modifications accompagnant l'agrégation est la phosphorylation de l'alpha-synucléine. La protéine est le plus souvent phosphorylée sur la sérine 129 qui représente un marqueur biologique de la maladie. C'est la modification post-traductionnelle la plus étudiée de l'alpha-synucléine. D'autres sites que la sérine 129 peuvent être phosphorylés comme la sérine 87 qui se trouve dans le domaine NAC et pourrait avoir un impact assez important et toxique dans les pathologies de l'alpha-synucléine. (23) On retrouve également de possibles phosphorylations

sur les tyrosines 39, 125, 133 et 136 mais peu de résultats sont connus sur l'impact éventuel de telles phosphorylations sur l'activité dans les cellules neuronales ou l'agrégation de la protéine dans ces pathologies. En effet, plusieurs études ont montré que la phosphorylation était toxique pour le cerveau car la protéine est insoluble et peut être sous forme d'oligomère toxiques. (1) Cette modification post-traductionnelle serait à l'origine de l'agrégation de la protéine et amènerait la mort neuronale. (23) (14)

f) La nitration et le stress oxydatif

La nitration est une modification post-traductionnelle qui peut témoigner de la présence d'un stress oxydatif pouvant être induit par un événement extérieur comme l'exposition à des substances chimiques toxiques. La nitration n'est pas véritablement un marqueur biologique spécifique de la pathologie de l'alpha-synucléine comme on peut le considérer pour la phosphorylation en sérine 129 utilisable en diagnostic, mais elle fait partie des modifications

observées dans la pathologie en lien avec le stress oxydatif. La nitration a lieu sur les tyrosines en présence de monoxyde d'azote ; le produit obtenu est la 3-nitrotyrosine.



(Figure 10) Comme la phosphorylation, il y a plusieurs sites de nitration sur la tyrosine en position 39, 125, 133 et 136. (27) (54)

Figure 10: Nitration de la tyrosine

g) La résistance à la digestion par les protéases

La mise en évidence de l'alpha-synucléine phosphorylée pathologique résistantes aux protéases peut être réalisée par l'utilisation d'un test de digestion à la protéinase K. Cette enzyme est capable de dégrader l'alpha-synucléine normale alors que sous sa forme agrégée pathologique, cette protéine est résistante à la digestion par cette enzyme. (72) (52) En effet, l'agrégation de la protéine associée à sa conformation en feuillets bêta empêchent la digestion de l'alpha-

synucléine. (10) (14) Grâce à cette technique, le marquage d'alpha-synucléine normale va disparaître, permettant la détection de l'alpha-synucléine pathologique sous sa forme protéase-résistante. La résistance à la digestion par la protéinase K peut ainsi être un argument important en faveur d'un changement de conformation de l'alpha-synucléine et le passage de la nucléation à la polymérisation de la protéine sous sa forme pathologique. Alors que ce critère reste encore assez modérément utilisé dans l'étude des synucléinopathies ou de façon relativement récente, il est très important de souligner que la résistance à la protéinase K est le critère essentiel qui permet d'identifier la protéine prion pathologique dans les maladies à prion ; la plupart des méthodes biochimiques de diagnostic reposent en particulier sur l'utilisation d'un traitement initial par les protéases.

h) Le système mitochondrial

L'âge de la mitochondrie joue un rôle essentiel dans le dysfonctionnement des neurones et dans l'accumulation des agrégats de protéine. L'alpha-synucléine a une action protectrice sur la mitochondrie au début de son fonctionnement puis son accumulation et son agrégation la rendent toxique pour la cellule neuronale. (73) Les mutations liées à l'ADN n'améliorent pas le fonctionnement normal du cerveau car elles peuvent devenir nocives, et le seuil d'énergie (ATP) diminue en dessous de la normale. Tous ces dysfonctionnements, l'accumulation d'agrégats protéiques, les mutations et l'âge avancé de la mitochondrie vont produire un dysfonctionnement très sévère des mitochondries et déclenche une baisse significative de l'ATP ce qui est critique et insuffisant au bon fonctionnement neuronal. Ces différents problèmes de fonctionnement de la mitochondrie joueraient un rôle important dans le développement de la maladie de Parkinson. (25)

Les formes familiales de la maladie de Parkinson ont souvent un lien avec la mitochondrie.

En effet, en jouant un rôle dans la signalisation du Ca^{2+} des mitochondries, l'alpha-synucléine peut induire la mort cellulaire et la formation d'un phénomène d'oxydation. (57)

D'autres cibles moléculaires peuvent être associées au développement de la maladie de Parkinson :

- L'inhibition du pouvoir du complexe 1 mitochondrial ou appelé pompe à protons est essentiel pour le bon fonctionnement de la mitochondrie. Il peut être inhibé par des pesticides comme la roténone ou des substance chimiques telles que le MPTP, des contaminants dont le lien avec la MP a été démontré. (64)
- Le dysfonctionnement au niveau de Pink1 et Parkin, deux gènes qui entraînent une inhibition du complexe 1 et impactent le fonctionnement de la mitochondrie et son autophagie. Parkin agit dans la régulation de la dégradation de protéines par le protéasome. Pink1 active la parkine, et en cas de problème de fonctionnement, elle induit une diminution significative de la dopamine et de l'ATP. (50)
- La fission et la fusion de la mitochondrie régule la mort cellulaire et la mitophagie (dégradation des mitochondries par autophagie). La fission facilite la mort cellulaire, le transport de protéines et la mitophagie alors que la fusion bloque la mitophagie. La fission permet de recycler les mitochondries ou de les envoyer directement en mitophagie alors que la fusion ramène la mitochondrie à l'étape précédente. L'alpha-synucléine est directement régulée par la mitophagie dans les phénomènes de fusion-fission et le transport des protéines. (35)

i) Influence du pH et de la température

L'alpha-synucléine est une protéine qui s'agrège plus facilement à pH acide qu'à pH neutre mais également à des températures plus élevées. L'alpha-synucléine est sensible aux changements des conditions environnementales ce qui entraîne un dysfonctionnement de son action. Par exemple, une protéine dans un pH plus acide va plus vite s'agréger que dans un pH neutre et à des températures plus élevées. (2)

j) Le dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome

Le contrôle du milieu cellulaire est régulé par l'homéostasie des températures, pressions et pH.

(2) L'homéostasie de l'alpha-synucléine est régulée par des systèmes de contrôle comme le système ubiquitine-protéasome ou la voie lysosomiale.

Lorsque l'alpha-synucléine est agrégée et se présente sous forme de corps d'inclusion intracellulaires, elle y est associée à de l'ubiquitine. (41) Quand elle est surexprimée, elle induit une action inhibitrice sur le protéasome en diminuant la dégradation des protéines par ce mécanisme, ce qui peut entraîner une accumulation de protéines dans le milieu intracellulaire et devenir extrêmement neurotoxique. L'alpha-synucléine se lie aux sous unités importantes du protéasome, 19S ou 20S, pour les détruire et limite ainsi la dégradation de l'alpha-synucléine pathologique. Comme elle n'a pas pu être dégradée, des fragments de la protéine ont été dispersés et peuvent s'agréger ensemble. L'assemblage du protéasome est compromis, les fragments d'alpha-synucléine peuvent s'agréger de nouveau et détruire le protéasome ce qui rendrait l'intérieur de la cellule très toxique et conduirait à la mort neuronale.

Le même mécanisme agit sur les lysosomes : l'alpha-synucléine présente dans les vésicules peut se lier aux membranes et inhiber l'autophagie en modifiant les fonctions du lysosome régulé par le chaperon. (20).

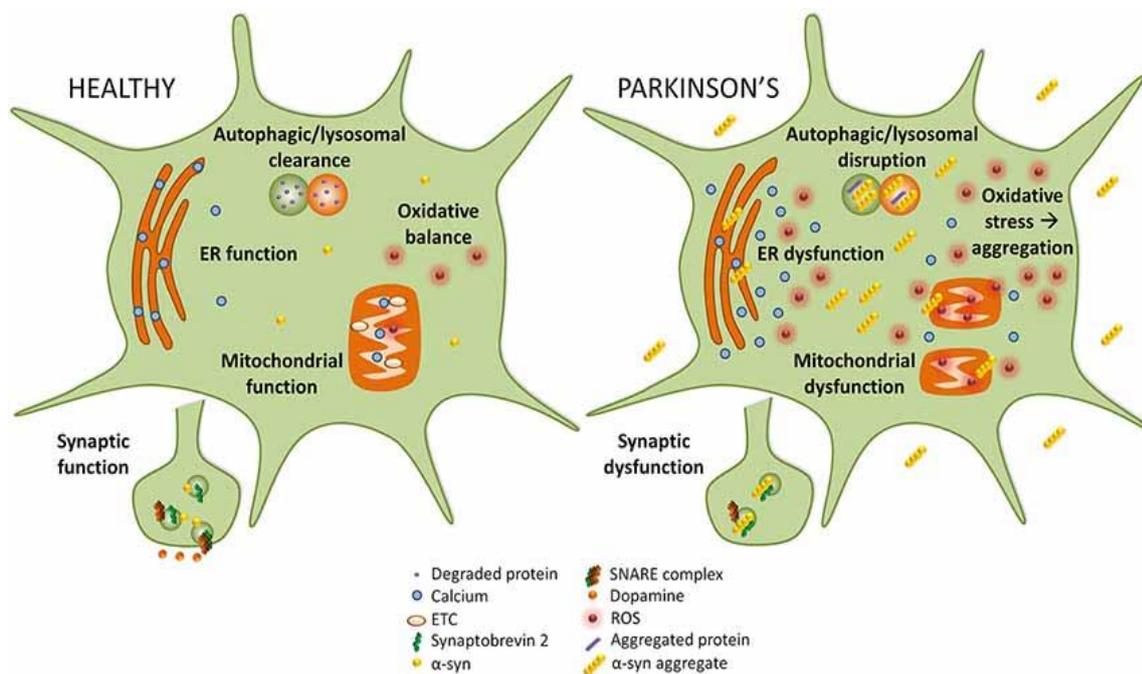


Figure 11 : Représentation d'une cellule neuronale saine et d'une cellule neuronale d'un parkinsonien

D'après Carroll Rutherford Fields dans *Molecular Neuroscience*

Dans la figure 11, la cellule neuronale saine ne présente aucun dysfonctionnement. Dans la maladie de Parkinson, tous les disfonctionnements présents ont été discutés auparavant, les dysfonctionnements sont situés au niveau du réticulum endoplasmique, la mitochondrie, de l'autophagie. Un phénomène de stress oxydatif entraîne l'agrégation de la protéine ce qui entraîne un dysfonctionnement dû à l'alphasynucléine phosphorylée et du transport de la protéine. (Figure 11)

Différents dysfonctionnements cellulaires et moléculaires complexes peuvent ainsi accompagner la maladie de Parkinson lorsque l'alpha-synucléine s'agrège et change de conformation, engendrant une importante neurotoxicité et ultimement la mort neuronale.

III. La maladie de Parkinson et le paraquat

1. Découverte d'un lien possible entre une substance chimique et la maladie de Parkinson

Dans les années 1980, une hypothèse a été émise lors de la découverte de plusieurs cas de syndrome parkinsonien parmi des toxicomanes suite à des injections par voie intraveineuse de substance contenant du 1-méthyle-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydro pyridine aussi appelé MPTP (10) (36). Le premier cas a été déclaré en 1976 chez un jeune toxicomane américain qui s'est injecté une substance contenant du MPTP : quelques jours après il a développé des symptômes de la maladie de Parkinson. Deux ans plus tard, le jeune homme est mort d'une overdose et l'autopsie de son cerveau a permis de mettre en évidence une dépigmentation de la substance noire, une destruction des neurones dopaminergiques et des inclusions de protéines (10) (36).

D'autres cas sont apparus (quatre en tout), qui, quelques semaines après leur injection de MPTP, ont développé des symptômes caractéristiques de la maladie de Parkinson. Les personnes qui ont été exposées à cette drogue ne représente qu'une minorité de personnes mais une hypothèse a été émise concernant le rôle causal possible d'une substance chimique neurotoxique, des facteurs génétiques ayant également pu accentuer les effets de cette drogue et entraîner le développement de la pathologie (4).

L'identification d'un lien entre la maladie de Parkinson et l'exposition à des pesticides a été établie suite à cette histoire et plusieurs études ont confirmé l'effet neurotoxique du MPTP.

2. Le MPTP

Le MPTP (1-méthyle-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydro pyridine) est en effet plus un contaminant imprévu découvert au cours du processus de fabrication d'un composé chimique de synthèse, à usage récréatif, par un étudiant en chimie : ce n'est pas un pesticide mais il s'est révélé être un puissant neurotoxique pour le système nerveux dopaminergique. Sa structure chimique est

rapidement apparue très proche de celle d'un herbicide largement utilisé, le paraquat, (Figure 12), et le MPTP s'est révélé être un inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale. (63)

Dans le cerveau, le MPTP est métabolisé en MPP⁺, le 1-méthyl-4-phenylpyridinium (Figure 12). Le MPP⁺ est l'espèce moléculaire neurotoxique et non le MPTP, car le MPP⁺ franchit la barrière hémato-encéphalique et est liposoluble. Lors de sa transformation en MPP⁺,

il devient très toxique et il détruit principalement les neurones dopaminergiques présents dans la substance noire. (38)

D'un point de vue moléculaire, le MPP⁺ agit sur le complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie ce qui a un effet délétère, entraînant la mort du neurone dopaminergique. Le MPP⁺ est transporté dans le milieu intracellulaire par les transporteurs de la dopamine. Le MPTP suite à son action sur les neurones dopaminergiques induit ainsi le syndrome parkinsonien chez ces sujets exposés à cette substance. Cette molécule est peu active dans les modèles de rongeurs contrairement à l'humain qui déclare des syndromes parkinsoniens (38)

En 1984, Langston et son équipe ont observé un syndrome parkinsonien chez un singe suite à l'injection de MPTP. Ils ont réussi à réduire les symptômes de la maladie de Parkinson en injectant un neurotransmetteur appelé la dopamine pour compenser le déficit en dopamine expliquant les symptômes moteurs caractéristiques de la maladie (37).

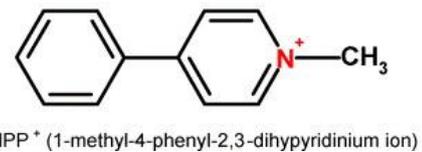
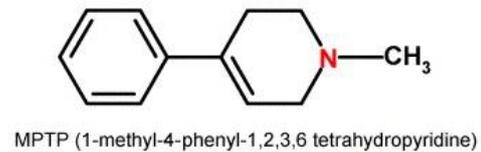
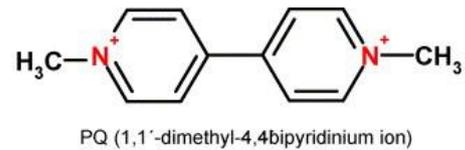


Figure 12 : Structures chimiques comparées du paraquat (PQ), du MPTP et du MPP⁺

3. Le paraquat

Le paraquat (dichlorure de 1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridinium) est un herbicide non sélectif. Il est l'herbicide le plus utilisé dans le monde. Il a été commercialisé en 1961 par Imperial Chemical Industrie. C'est un produit phytosanitaire (pour soigner les plantes) appartenant à la famille des pyridines comme le MPTP. Le paraquat est très toxique voire mortel s'il est ingéré et une toxicité peut également être retrouvée lors d'une exposition prolongée, ce qui peut être le cas des agriculteurs. Selon le mode d'exposition au pesticide, plusieurs effets ont été observés : par inhalation, la personne déclare des maux de tête, de la toux et par contact, des rougeurs ou des douleurs aux yeux ont été observés. De très grande doses de paraquat peuvent entraîner la mort du patient rapidement. Il a été interdit en France et en Europe en 2007 mais il reste utilisé dans d'autres pays du monde, notamment aux États-Unis ou dans les pays en voie de développement. Le paraquat est utilisé dans de nombreuses cultures pour des produits alimentaires comme le blé, le maïs, le café, la pomme, la banane et d'autres productions sont aussi concernées.

Cette similitude entre les deux molécules, MPTP et paraquat, au niveau structural (Figure 12) et l'observation faite sur le MPTP a motivé plusieurs équipes à entreprendre des études sur le rôle de l'exposition aux pesticides et particulièrement le paraquat dans la maladie de Parkinson (37).

Ainsi, il a été montré que cet herbicide peut induire la maladie de Parkinson et déclencher un stress oxydatif chez la souris. C'est un composé liposoluble capable de traverser la barrière hématoencéphalique et ainsi de se retrouver dans le cerveau où il est métabolisé et devient toxique pour l'homme et l'animal. Tout comme le MPP+, le paraquat en dérégulant la chaîne respiratoire mitochondriale va inhiber le complexe I de ce système et va induire le phénomène de mort cellulaire de certaines cellules comme les neurones dopaminergiques dans la substance noire. (38) Il a été aussi démontré que l'utilisation du paraquat avec un autre pesticide, par exemple le maneb augmente de deux fois la possibilité de déclarer une maladie de Parkinson et avoir un effet sur l'alpha-synucléine (54) (62) (34)

4. Lien entre la maladie de Parkinson et le paraquat

La maladie de Parkinson peut être liée à des effets environnementaux ou à l'exposition chronique ou inhabituelle à une substance chimique. Dans le monde agricole, les pesticides telles que les herbicides, les fongicides et les insecticides sont largement utilisés seul ou en un mélange de plusieurs substances chimiques.

Une étude épidémiologique réalisée aux Etats Unis dans les Etats de l'Iowa et la Caroline du Nord appelé « Agricultural Health Study » a été entreprise sur des agriculteurs. (34) Les agriculteurs ont répondu à des questions pour les classer en groupe. Les agriculteurs exposés inhabituellement à un composé chimique était inclus dans un groupe où cette exposition pourrait avoir un lien entre la maladie et cet incident. L'utilisation d'un équipement de protection peut avoir un rôle majeur sur la protection du sujet contre ces produits dangereux.

Par la suite, des informations sur le patient et leur exposition ont été récupérées et collectées. Les personnes exposées quotidiennement présentaient des symptômes de neurodégénérescence ou la maladie de Parkinson et un diagnostic a pu être posé. (34) Les pesticides peuvent avoir un rôle majeur sur l'être humain et particulièrement certains d'entre eux qui sont aujourd'hui interdit en France et en Europe. Le paraquat, le maneb et la roténone sont les pesticides avec un haut ratio d'incidence. Le paraquat entraîne une dégénérescence nigostriale dans des animaux par exemple, cité dans l'étude Agricultural Health Study. (34)

Le risque de contracter la maladie de Parkinson est plus importante chez les personnes ayant eu une carrière dans le milieu agricole et exposées quotidiennement à certains pesticides comme le paraquat.

Une étude a été réalisée en France appelé AGRICAN sur des patients ayant travaillé dans le monde agricole et affilié à la Mutualité Sociale Agricole. (62) Ces travaux ont été réalisés entre les années 2005 à 2007 sur 181 842 participants qui représentent donc la plus grande étude

réalisée sur ce sujet. Les personnes étaient âgées de plus de 18 ans et ont été questionnés sur leur âge, sexe, leurs loisirs, l'absence ou non de consommation de tabac et d'alcool et leur domaine d'activité de travail. Toutes ces informations ont été répertoriées et triées dans des groupes. Les sujets ont été questionnés pour savoir s'ils avaient été diagnostiqués par un médecin ou non et s'ils présentaient plus de deux symptômes de la maladie de Parkinson. (62)

L'utilisation de pesticides est le point de l'étude le plus important, cela permet de déterminer s'il existe un lien entre une exposition à ces substance chimique et la maladie. Les pesticides les plus utilisés étaient le paraquat, le manèbe et la roténone, la plupart de ces substances chimiques sont actuellement interdites en France à cause de ce lien de cause à effet entre les pesticides et la maladie de Parkinson. Cette étude montre que le risque d'avoir la maladie de Parkinson augmentait en présence de ces pesticides, et plus la durée d'exposition est grande plus la probabilité d'avoir cette maladie sont grandes ce qui explique le lien entre ces deux facteurs. (62)

Les pesticides ont donc un lien direct entre le déclenchement de la maladie de parkinson, ce lien a permis en France de reconnaître cette pathologie en tant que maladie professionnelle.

IV. Modèles animaux d'étude des synucléinopathies

1. Modèles transgéniques, surexpression de l'alpha-synucléine par transgénése

Le modèle M83 est une lignée de souris transgénique exprimant l'alpha-synucléine humaine mutée en A53T (Thréonine 53 en Alanine) sous contrôle du promoteur du prion. En 2002, l'équipe de Virginia Lee et Benoît Giasson ont créés ce modèle murin au « Center for Neurodegenerative Diseases Research » de l'université de Pennsylvanie. Il est actuellement commercialisé par les laboratoire Jackson avec la référence B6; C3H-Tg(SNCA)83Vle/J). Le modèle TgM83 exprime le transgène de l'alpha-synucléine sous la forme mutante humaine mais

également la forme endogène murine issue de la transgénèse des souris sur un modèle B6/C3H qui expriment l'alpha-synucléine murine (28).

Ces souris développent spontanément des signes cliniques lors du vieillissement qui se manifestent par une paralysie du train arrière, troubles locomoteurs qui sont associés à l'agrégation de l'alpha-synucléine à partir de l'âge de 8 mois et jusqu'à l'âge de 22 mois lorsque les souris sont homozygotes pour le transgène.



Figure 13 : Souris TgM83 symptomatique à un stade sévère lié à sa pathologie au stade terminal

(28) Les premiers signes cliniques observés dans ce modèle sont une perte de poids, et la mobilité réduite de la souris qui intervient avec la paralysie d'un membre postérieur jusqu'à la paralysie total du train arrière (Figure 13) (28). Ces troubles sont d'évolution progressive et peuvent, lorsqu'ils évoluent, conduire à des difficultés pour les animaux à se nourrir ou à s'abreuver. Les animaux doivent être euthanasiés dès l'expression des premiers symptômes pour des raisons éthiques et le temps entre les symptômes et l'euthanasie est très court, de quelques jours seulement.

Lorsque l'animal développe la maladie, l'étude du cerveau permet d'étudier la nature de l'alpha-synucléine, si elle est sous la forme cytoplasmique, nucléaire et/ ou agrégée.

En effet, dans le cerveau des souris M83, l'alpha-synucléine peut être détectée par immunomarquage sous forme d'agrégats dans le cytoplasme mais également dans les prolongements neuronaux. (28) Ces immunomarquages sont essentiellement localisés dans les parties postérieures du cerveau comme le tronc cérébral, le mésencéphale et le thalamus mais en faible quantité dans les parties antérieures du cerveau. (28)

Dans le modèle M83, il est donc intéressant d'étudier la souris lorsqu'elle est malade mais aussi avant la maladie. L'observation de ce modèle avant la maladie permet de comprendre le

fonctionnement de l'alpha-synucléine et son développement pour arriver à la phase de la maladie.

Au début de leur développement, à partir de trois mois la souris M83 développement des immunomarquages d'alpha-synucléine nucléaires à un jeune âge (6). Plus l'animal avance dans le temps, plus il présente une localisation de la protéine différente dans la cellule en particulier lors du déclenchement de la pathologie où l'alpha-synucléine est localisé dans les cytoplasmes et les prolongements neuronaux.

La résistance aux protéases est induite par les modifications post-traductionnelles de la protéine, cette recherche de résistante est réalisée pour rechercher la présence d'agrégat de la protéine (72), la protéine est résistante aux protéases principalement quand la souris est malade, les immunomarquages de l'alpha-synucléine sont retrouvés dans le cytoplasme et dans les prolongements des neurites. L'apparition de résistance à la protéinase K peut être détectée des âges précoces (dès 3 mois), dans le cortex et l'hippocampe présentant des immunomarquages principalement nucléaire (72). Le cortex et l'hippocampe sont deux régions qui démontrent un développement différent de l'alpha-synucléine localisée dans le noyau des cellules et est résistant à la protéinase K contrairement aux autres régions du cerveau. L'alpha-synucléine résistante aux protéinases dans ces régions montrent une agrégation de la protéine dans ces deux régions avant la maladie. (22) (72)

2. Modèle d'inoculation d'une substance chimique (MPTP-Paraquat-Paraquat+Maneb)

Un autre modèle de développement des synucléinopathies peut être généré par injection de substances chimiques telles que le paraquat seul ou combiné au maneb.

L'inoculation d'une substance chimique peut se réaliser par différentes méthodes, par exemple la voie intrapéritonéale (54) et par voie orale (51). La voie intrapéritonéale est la plus répandue,

la quantité injectée de pesticide est contrôlée et précise. Un cocktail de paraquat et maneb est injecté une fois par semaine pendant trois semaines sur des souris wild type ou A53T (lignée M83) pour observer un effet de ce mélange sur les animaux. Cette expérimentation a permis de montrer un effet des pesticides combinés sur le développement de la maladie des animaux et l'agrégation de l'alpha-synucléine. Une deuxième information a été mise en avant, le paraquat seul n'a aucun effet sur les animaux M83 jeunes inoculés.

Les animaux sont euthanasiés à 3 mois, un âge très jeune pour voir s'il existe un effet dès le jeune âge et d'autres 8 et 12 mois pour prendre en compte l'intervalle où la maladie peut se déclarer avec des signes cliniques. (54)

L'exposition par voie orale est aussi une méthode d'inoculation quotidienne en mettant ces substances dans l'eau des biberons. L'eau de boisson mélangée au paraquat représente une quantité absorbée de 10mg/kg/jour en moyenne par les animaux chaque jour, les modèles M83 et C57Bl6 (souris WT) ont été les modèles choisis dans cette étude. Chez les souris jeunes, aucun changement de morphologie ou de localisation de l'alpha-synucléine n'a été observée dans le cerveau alors que sur l'intestin il y a un effet du paraquat sur cette protéine. (51) Ces modèles animaux ne présentent pas de signes cliniques car ils sont euthanasiés très jeune avant l'âge où les signes cliniques peuvent apparaître.

Le modèle C57Bl6 est aussi utilisé avec des injections en IP de 10mg/kg de paraquat deux fois par semaine pendant trois semaines consécutives. Le paraquat entraîne l'agrégation de l'alpha-synucléine en sa présence et il a un rôle neurotoxique pour le cerveau (44)

L'utilisation de substance chimique comme le paraquat peut entraîner des dommages dans le cerveau et un effet sur la protéine alpha-synucléine.

3. Modèle d'inoculation d'adéno-virus

L'inoculation d'adéno-virus (AAV) est utilisée pour observer les phases précoces de la maladie de l'alpha-synucléine.

Ces AAV sont inoculés dans des souris C57Bl6 par voie intracérébrale dans les ventricules dans le cerveau. (15). La souris ne présente aucun signe clinique dans ces expérimentations car les animaux sont sacrifiés très tôt à un, trois et six mois. Deux groupes sont proposés des AAV alpha-synucléine et des AAV GFP qui sont les témoins de l'expérimentation. Les animaux ne présentent aucun signe locomoteur mais la quantité d'alpha-synucléine augmente entre un et trois mois et diminue à partir de six mois. La partie antérieure de ces souris est principalement immunomarquée par l'alpha-synucléine. (15)

Ce modèle a une fonction d'analyse précoce des synucléinopathies à travers l'utilisation d'un AAV alpha-synucléine dans une souris C57Bl6 qui ne développe pas spontanément la pathologie.

4. Modèle d'inoculation de fibrilles et d'agrégats d'alpha-synucléine

Des modèles d'inoculation d'alpha-synucléine sous la forme de fibrilles et d'agrégats sont utilisés. L'injection de matériel biologique issu d'extraits cérébraux d'animaux malades est une technique très utilisée (49) (76) (66). Le modèle M83 avec un génotype différent, homozygote ou hémizygotique inoculé à la naissance par des inoculum d'extrait cérébraux de souris M83 malade permet d'observer une accélération de la pathologie différentes selon le génotype utilisé. Les souris M83 homozygotes développent plus rapidement la maladie avec des signes cliniques que le modèle hémizygotique pour l'alpha-synucléine mutante en A53T.

Des études développent différentes méthodes d'inoculation avec différents inoculum comme les extraits cérébraux d'animaux malade, de l'atrophie multisystématisée (MSA) humaine ou des fibrilles d'alpha-synucléine recombinantes. L'inoculation se fait soit par voie intrapéritonéale veineuse, cérébrale ou par gavage (42). La voie cérébrale (49) (76) (66) est la

méthode la plus rapide pour développer la maladie suivie par la voie veineuse, intrapéritonéale et le gavage par voie orale. Le mode d'inoculation a un impact sur le développement de la maladie en termes de temps et de propagation.

Le type de fibrilles injectées dans les animaux peut avoir un effet potentiel sur le développement dans le cerveau de la maladie. L'utilisation de souris hémizygote pour le gène alpha-synucléine humaine mutante en A53T permet d'augmenter la durée d'observation de la pathologie car la maladie spontanée ne commence qu'à partir de 18 mois dans une souris vieillissante. Différents types d'inoculum ont été utilisés, de la MSA humaine, des fibrilles d'alpha-synucléine salées ou non salées et des extraits cérébraux de souris M83 malade. Les fibrilles non salées ont un développement identique aux extraits cérébraux de souris M83 malade alors que les fibrilles salées ont une répartition identique à celle de la MSA. (39)

Il existe des inoculums d'alpha-synucléine amplifiés par la méthode de produit d'amplification *in vitro* (PMCA), l'injection en cérébral est la plus rapide pour développer la pathologie. L'amplification est une méthode efficace où les étapes de sonication ont une importance majeure car elle entraîne l'agrégation de la protéine. (53) (39) Les souris M83 présentent des 3 mois des signes cliniques de la maladie. Des immunomarquages nets d'alpha-synucléine apparaissent dans le cytoplasme des cellules et des prolongements dans tout le cerveau.

La nature de l'inoculum, la quantité injectée, le génotype et le lieu de l'injection sont des facteurs importants dans le développement de la maladie, de la propagation et la forme de l'alpha-synucléine phosphorylée.

Matériel et méthodes

Dans ce travail les échantillons biologiques (prélèvements cérébraux fixés) provenant de différentes expérimentations animales ont été utilisés (Tableau 1), réalisées soit (modèle M83) dans la lignée transgénique murine M83 exprimant l'alpha-synucléine humaine mutée A53T sous contrôle du promoteur prion, soit (modèle AAV) chez la souris C57Bl/6 KO alpha-synucléine exprimant l'alpha-synucléine humaine mutée A53T à l'aide d'un vecteur viral adéno-associé et sous contrôle du promoteur de la synapsine. Dans notre panel d'échantillon, plusieurs expérimentations sur nos deux modèles ont été réalisées :

- Des souris M83 jeune de 2, 8, 10 mois
- Des souris M83 âgés de 16 mois
- Des souris malades suite à leur vieillissement spontanée
- Souris malades suite à des injections :
 - Extraits cérébraux pathologiques
 - Agrégats produits in vitro par PMCA à partir d'extrait cérébraux malade (selon la technique décrite dans l'article de Nicot 2019) (53)

L'étude de l'effet de l'exposition par l'eau de boisson à un herbicide, le paraquat, a été réalisée dans ces deux modèles expérimentaux avec l'objectif d'évaluer son effet éventuel sur les modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine (phosphorylation en sérine 129, nitration, résistance à la protéinase K). Chez les souris M83, l'exposition au paraquat à la concentration de 10 mg/kg/jour est à la concentration de 10mg/kg/jour et a été réalisée à partir de l'âge de 2 mois et jusqu'à l'âge de 8 ou 10 mois, (Tableau 1) partir duquel peuvent se manifester, les signes cliniques de paralysie caractéristiques du modèle M83 lors du vieillissement normal. Pour les animaux contrôles, l'eau est distribuée *ad libitum*. Une

estimation de la consommation a été réalisée dans les travaux antérieurs du laboratoire afin d'évaluer l'exposition moyenne (51).

L'expression de l'alpha-synucléine humaine A53T a par ailleurs été obtenue dans un petit groupe de 6 animaux après inoculation d'un virus adéno-associé chez des souris « C57Bl/6 KO », souris C57Bl/6 conventionnelles qui n'expriment pas l'alpha-synucléine murine. (Tableau 1) Dans cette expérience, les souris ont été inoculées de 2,5µL d'AAV soit 6,25 10⁸ génome viral dans du tampon PBS-Iodixanol par voie intracérébrale ventriculaire (ICV) dans chaque hémisphère, permettant d'obtenir l'expression neuronale de la protéine humaine. (15) Les animaux, dont trois d'entre eux étaient issus d'un groupe expérimental exposé à partir de l'âge de 2 mois au paraquat comme chez les souris M83 précédemment décrites, ont été sacrifiés à l'âge de 5 mois.

Lignée	Génotype de la protéine alpha-synucléine exprimée	Exposition au paraquat par eau de boisson	Temps d'exposition	Dose de paraquat	Date de sacrifice
TgM83	Humaine mutée en A53T (promoteur prion)	4 animaux exposés 3 animaux témoins	6 mois	50 µg/mL de paraquat préparée soit 10mg/kg/jour	8 mois
TgM83	Humaine A53T (promoteur prion)	4 animaux exposés 4 animaux témoins	8 mois	50 µg/mL de paraquat préparée soit 10 mg/kg/jour	10 mois
TgM83	Humaine A53T (promoteur prion)	Souris contrôle jeune	/	/	2 mois
TgM83	Humaine A53T (promoteur prion)	Souris contrôle en vieillissement	/	/	16 mois
TgM83	Humaine A53T (promoteur prion)	Souris contrôle en vieillissement malade et symptomatique	/	/	1 an
TgM83	Humaine A53T (promoteur prion) inoculé en ICV de 2 uL d'extrait cérébraux pathologique de TgM83 dans chaque ventricule latéral à la naissance	4 animaux	/	/	7, 11 et 14 mois
TgM83	Humaine A53T (promoteur prion) inoculé en IP de 50 uL d'extrait cérébraux pathologique de TgM83 par voie intrapéritonéale à la naissance	4 animaux	/	/	10, 11,13 et 17 mois
TgM83	Humaine A53T (promoteur prion) inoculé en IC par stéréotaxie	3 animaux	/	/	3 mois

	0,25um/min de 10% d'homogénat de cerveau malade traité par PMCA (agrégat produits in-vitro) dans le striatum gauche à 6 à 8 semaines				
C57Bl/6 KO	AAV mutée A53T humaine en ICV à la naissance (2.5 µL d'AAV par ventricule soit 6,25 10 ⁸ génome viral dans du tampon PBS-Iodixanol)	3 animaux exposés 3 animaux témoins	3 mois	50 µg/mL de paraquat préparée soit 10 mg/kg	5 mois

Tableau 1 : Tableau des lignées d'animaux utilisées dans cette étude et leurs caractéristiques correspondantes

1. Collecte des échantillons biologiques

Les animaux sont perfusés lors du sacrifice avec une solution de Tris buffer saline commerciale composée de 10% de tris buffer saline concentré 10 fois et 90% d'eau purifiée. Cette perfusion permet d'éliminer le contenu sanguin du système vasculaire et contribue à limiter le bruit de fond lors de la mise en œuvre de la technique d'immunohistochimie.

Les cerveaux sont prélevés et fixés dans du formol à 4% tamponné pendant plusieurs jours, permettant d'immobiliser les structures tissulaires et cellulaires dans l'état le plus proche du tissu à l'état vivant. Avant l'inclusion du tissu en paraffine, il faut recouper le cerveau soit en coupe sagittale soit en coupe coronale selon la question biologique qui va déterminer les régions neuro-anatomique examinées.

2. Principes généraux à l'histologie et à l'immunohistochimie

A. Inclusion en paraffine

La déshydratation et l'inclusion constituent la deuxième étape du processus de préparation du tissu, elle consiste à passer les échantillons dans différents bains d'alcool, de xylène puis de paraffine. Les bains successifs d'alcool sont dans le sens croissant des degrés (75°, 95° puis 100°) ; les passages dans le xylène puis dans la paraffine en surfusion à 60°C permettent de terminer l'inclusion des tissus. Le but de cette étape est de remplacer l'eau présente dans le tissu

par de la paraffine permettant ensuite de réaliser les coupes tissulaires, à 4,5 μm , à l'aide d'un microtome. Le tissu ainsi inclus en bloc de paraffine peut être conservé indéfiniment avant la réalisation de coupes tissulaires.

B. Mise en bloc

L'échantillon est mis en bloc dans de la paraffine en surfusion à 60°C. Les échantillons sont positionnés dans un ordre et un sens précis pour retrouver plus facilement la localisation des régions neuro-anatomiques importantes.

C. Réalisation des coupes tissulaires

Avant de pouvoir commencer un marquage immunohistochimique, il est nécessaire de déparaffiner les coupes tissulaires pour que les anticorps pénètrent dans les cellules et permettent la reconnaissance des protéines d'intérêt. Nous passons ainsi à nouveau les coupes dans des bains successifs de xylène et de 70%,95% et 100% d'alcool pour enlever la paraffine présente dans le tissu. Quand les tissus sont déparaffinés, le protocole d'immunohistochimie peut commencer.

Il est important de refroidir un maximum les blocs de paraffine avant de couper les échantillons au microtome. Les blocs ne doivent pas chauffer au moment de la découpe, sans quoi il sera impossible de couper correctement et de défriper l'échantillon. Nos coupes sont réalisées à 4,5 μm et sont déposées dans un bain marie à 41°C pour être défripées puis récupérées en coupe flottante sur lames. La préservation de l'architecture tissulaire lors de la réalisation de ces coupes représente une étape critique compte-tenu de la nécessité dans nos travaux de pouvoir identifier précisément les régions neuro-anatomiques d'intérêt.

D. Immunohistochimie (IHC)

L'alpha-synucléine et ses modifications post-traductionnelles sont détectées en utilisant différents anticorps, ainsi qu'éventuellement après un traitement à la protéinase K qui permet de révéler les formes agrégées – protéinase K- résistantes -- de la protéine.

Le protocole d'IHC se déroule sur deux jours en plusieurs étapes : (Tableau 2)

1. Le démasquage antigénique est nécessaire essentiellement à la libération des épitopes spécifiques et permet d'augmenter la spécificité de leur détection.
2. La dénaturation des protéines permet d'obtenir un signal plus important de la protéine d'intérêt.
3. Le blocage des peroxydases permet la neutralisation des peroxydases endogènes en vue de la coloration au DAB (3,3'-Diaminobenzidine) qui est oxydé par les peroxydases en un produit coloré.
4. La saturation représente le blocage des sites non spécifiques à l'aide d'un bloquant commercial, qui supprime les interactions non spécifiques protéine-protéine en se positionnant sur ces sites. Cette étape se déroule avant l'incubation avec les anticorps de détection, primaire puis secondaire.
5. L'incubation avec l'anticorps primaire de détection à une température de 4°C durant une nuit permet sa fixation sur la protéine alpha-synucléine et l'épitope spécifique choisis.
6. Le lendemain 3 rinçages au TBS-T sont réalisés pour éliminer l'excédent d'anticorps
7. De nouveau, le bloquant est déposé (étape 4) pour éviter un signal non spécifique
8. L'anticorps secondaire est ensuite déposé pendant une 1h à température ambiante permettant la fixation d'un anticorps anti-immunoglobulines de lapin ou souris sur les anticorps primaires fixés à la protéine alpha-synucléine, (Figure 13)

9. La révélation par Impact DAB permet le couplage avec l'anticorps secondaire qui transforme le DAB en un produit coloré et de localiser la protéine que l'on recherche. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire d'inactiver les peroxydases endogènes initialement présentes dans le tissu. (Figure 14)

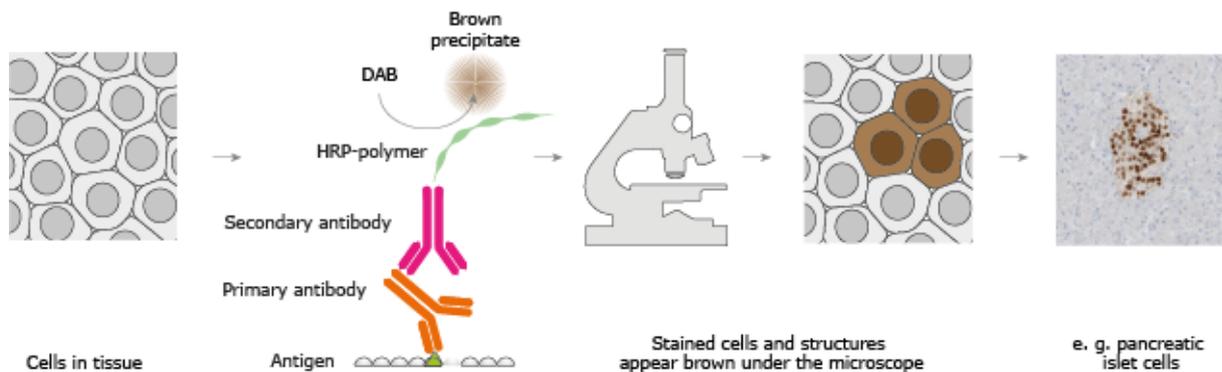


Figure 14 : Principe de précipitation du DAB en immunohistochimie

10. Le substrat de peroxydase ImmPACT DAB (HRP) réagit avec HRP pour donner un produit de couleur brune insoluble lorsque l'anticorps secondaire est reconnu. Il est 2 à 4 fois plus sensible que le kit de substrat DAB d'origine. (Figure 14)
11. La contre-coloration par l'hématoxyline colore les noyaux et aide au repérage des régions neuroanatomiques d'intérêt dans le cerveau. Cette étape se déroule dans l'automate de coloration (Gemini ES100 Varistain de Thermofisher), un programme spécial suivi par plusieurs étapes de rinçage d'eau courante, de l'éthanol et du xylène.
12. Le montage des lames est réalisé pour conserver les lames sans être dégradées. Une lamelle est déposée sur la lame avec de la colle. Dans notre laboratoire, nous utilisons la colleuse de lame (RCM 200 de Medite) , les lames se trouve dans un bac de xylène qui récupéré avec une pince où une goutte de colle est déposé uniformément et une lamelle est déposé sur la lame.

Etape d'un protocole d'immunohistochimie	Fournisseur	Nom commercial	Référence	Concentration
Démasquage antigénique	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma Aldrich 	<ul style="list-style-type: none"> • Acide formique • Tampon citrate pH 6 • Tampon EDTA pH 8,5 • Tampon Tris pH 10 	<ul style="list-style-type: none"> • 1002531 000 • C9999 • E1161 • T6455 	<ul style="list-style-type: none"> • 90%
Digestion	<ul style="list-style-type: none"> • Euromedex 	Protéinase K	<ul style="list-style-type: none"> • EU0090-B 	10µg/mL
Dénaturation des protéines	<ul style="list-style-type: none"> • Euromedex 	Thiocyanate de guanidinium d'Euromedex	<ul style="list-style-type: none"> • EU0046-D 	
Blocage des peroxydases	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma Aldrich 	H2O2, peroxyde d'hydrogène 30%	<ul style="list-style-type: none"> • H1009 	<ul style="list-style-type: none"> • 1/10
Bloquant	<ul style="list-style-type: none"> • Roche • Euromedex 	<ul style="list-style-type: none"> • Blocking Reagent • Tampon acide maléique 		
Anticorps alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129	<ul style="list-style-type: none"> • Abcam • Abcam • Abcam 	<ul style="list-style-type: none"> • Ab51253 • Ab59264 • MJFR13 	<ul style="list-style-type: none"> • Ab51253 • Ab59264 • MJFR13 	<ul style="list-style-type: none"> • 1/300 • 1/300 • 1/500
Anticorps alpha-synucléine nitrée en Tyrosine 39	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma Aldrich 	<ul style="list-style-type: none"> • Nsyn14 (d'après Norris and al., 2007) 		<ul style="list-style-type: none"> • 1/100
Anticorps anti-protéines nitrées totale	<ul style="list-style-type: none"> • Abcam 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 Nitro-tyrosine Ab 61392 		<ul style="list-style-type: none"> • 1/500
Anticorps secondaire	<ul style="list-style-type: none"> • Clinisciences • Clinisciences 	<ul style="list-style-type: none"> • Souris IgM • Lapin IgM 	<ul style="list-style-type: none"> • 	<ul style="list-style-type: none"> • 1/250 • 1/250
Amplificateur	<ul style="list-style-type: none"> • Clinisciences 	<ul style="list-style-type: none"> • Kit ABC HRP 	<ul style="list-style-type: none"> • PK-4000 	
Révéléateur	<ul style="list-style-type: none"> • Clinisciences 	<ul style="list-style-type: none"> • Impact DAB Peroxydase substrate 	<ul style="list-style-type: none"> • SK-4105 	
Contre-coloration	<ul style="list-style-type: none"> • Chimie plus • Chimie plus • Biognost Cliniscience • Sigma Aldrich 	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol • Xylène • Hématoyline de Harris au 1/2 de Tris Buffer • Tris Buffer • Eau courante 	<ul style="list-style-type: none"> • • • • T5912-1L 	<ul style="list-style-type: none"> • 70%, 90% et 100% • •
Colle lame	<ul style="list-style-type: none"> • Histolab 	<ul style="list-style-type: none"> • Pertex 		

Tableau 2 : Liste des produits utilisés lors de nos protocoles de manipulations en immunohistochimie

3. Critère d'analyse de l'étude

Plusieurs protocoles ont été mis au point pour la recherche de différentes protéines, l'alphasynucléine phosphorylée et nitrée, la nitration totale des protéines dans le cerveau. Ces recherches ont été centrée sur l'alphasynucléine phosphorylée dans le modèle M83 en vieillissement, sur des animaux inoculés avec du cerveau de M83 malade et des souris C57B16 KO alpha-synucléine injectées par des AAV alphasynucléine A53T à la naissance. Pour certaines expérimentations, les animaux ont été exposés par voie orale à un herbicide, le paraquat.

Le premier sujet a été la recherche de phosphorylation de l'alpha-synucléine dans nos souris malade pour voir l'efficacité de nos anticorps Ab 51253, Ab 59264 et MJFR13. Le choix de tester divers anticorps a été décidé pour vérifier s'il y avait des immunomarquages si tous les anticorps mettent en évidence les mêmes marquages et enfin l'absence de marquages non spécifiques. Lorsque tous ces facteurs ont été vérifiés, il a fallu choisir un anticorps de référence. J'ai décidé de poursuivre mon travail avec l'anticorps Ab51253 car il est déjà largement utilisé en biochimie dans notre laboratoire et sa spécificité a pu être validé. (66) (49)

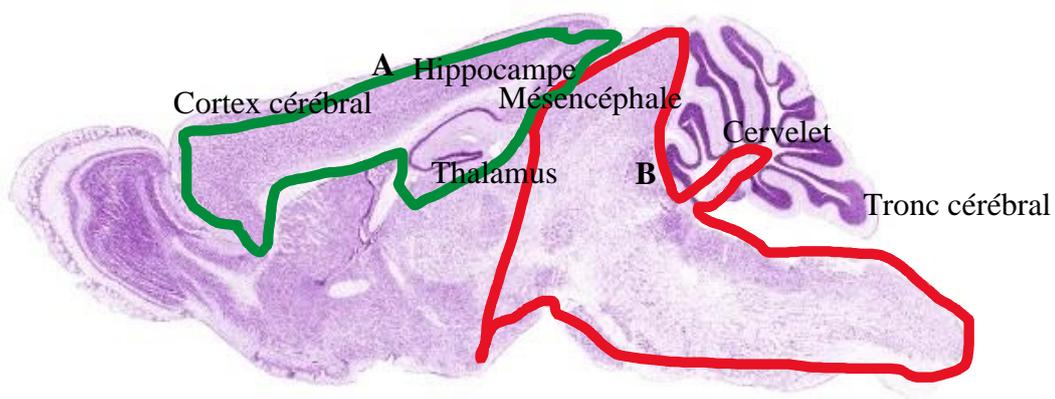


Figure 15: Zone d'étude du modèle M83

(A) Région de l'hippocampe et du cortex cérébral (inclusions nucléaires)

(B) Région postérieure lieu de la maladie : tronc cérébral, mésencéphale thalamus et cervelet

Cet anticorps permettant la détection de la phosphorylation de la sérine 129 de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 a été utilisé sur nos animaux en vieillissement et à différents âges pour voir l'apparition de la phosphorylation de l'alphasyneucléine phosphorylé dans le modèle M83. Plusieurs zones de marquages ont été observées au niveau du noyau et/ou du cytoplasme, la localisation du marquage a une signification précise sur le stade de la pathologie du modèle M83 et sur son état d'avancement. (Figure 15) Une question s'est posée : comment vérifier si certains immunomarquages pouvaient être résistants à une méthode de digestion qui nous aiderait à comprendre si la protéine peut être potentiellement agrégée. Une méthode a été retenue, la digestion de la protéinase K dans un premier temps sur un panel de souris vieillissante pour voir si tous nos types (nucléaires, cytoplasmique, neurites) de marquages sont éliminés suite à la digestion par cette enzyme.

La troisième partie est orientée vers l'alphasyneucléine nitrée avec l'anticorps Nsyn14 qui permet la détection d'après Norris 2007 de l'alphasyneucléine nitrée en tyrosine 35. Le stress oxydatif peut être induit par l'exposition à des pesticides comme le paraquat, nous avons testé un panel d'échantillon avec des souris jeunes, malades et exposées au paraquat.

Pour vérifier la présence de nitration dans le cerveau, nous avons décidé d'utiliser en complément un anticorps ciblant la 3-Nitrotyrosine qui détecte tous types de protéines nitrées présentes présente dans le cerveau. (27) Le choix de cet anticorps qui n'a aucun lien direct avec l'alphasyneucléine a été utilisé pour vérifier la présence de nitration dans le cerveau et vérifier que les immunomarquages des deux anticorps coïncident.

La deuxième démarche était l'observation de l'effet de l'alphasyneucléine sur un autre modèle inoculé par du cerveau malade dans des M83 ou des AAV alphasyneucléine A53T dans des C57Bl6 KO alpha-synucléine. Ces animaux ont été choisis pour observer le développement accéléré de la maladie dans le modèle M83. Les AAV sont utilisés pour observer la maladie

précoce de la M83 à travers une C57Bl6 KO pour vérifier l'évolution de la protéine alphasynucléine mutée en A53T.

4. Analyse d'image à l'aide du logiciel Fiji

L'analyse réalisée à l'aide du logiciel Fiji est très ciblée, il est utilisé pour quantifier une zone ciblée. Dans cette étude, je l'ai utilisé pour compter le taux d'alphasynucléine dans des zones choisies et voir si le paraquat a un effet sur l'alphasynucléine et sur sa quantité présente dans le cerveau des animaux exposés.

Fiji est une extension du logiciel ImageJ, dont la fonction principale est le traitement et l'analyse d'images en biologie. L'étude se réalise en plusieurs étapes consécutives pour traiter et analyser l'image prise au microscope Olympus BX51.

Avant de travailler sur une image, il faut réaliser en amont une macro, qui représente la programmation du chemin de commande du logiciel nécessaire à l'analyse de l'image.

Par exemple, pour le comptage de noyaux neuronaux présents dans le cerveau tel que nous l'avons réalisé, nous enregistrons toutes les étapes (commandes) nécessaires à l'analyse à travers la macro ce qui est un gain de temps et évite les mauvaises manipulations lors de la réalisation manuelle du chemin des différentes étapes dans le logiciel.

Utilisation de Fiji :

L'analyse de la quantité du nombre d'immunomarquage d'alphasynucléine phosphorylée en sérine 129 a été réalisée à l'aide du logiciel d'imagerie Fiji (créé par l'institut national de la santé). Ces études ont été ciblées dans le tronc cérébral, l'hippocampe et le cortex cérébral. Les images ont été prises sur un microscope Olympus et une caméra Luminera. Les images ont été capturées en x4, x20 et x40 pour différentes coupes avec les régions d'intérêts choisies. Les coupes de cerveaux ont été préparées à 5 µm pour tous les animaux. Au microscope, une image a été prise puis utilisée par Fiji, suite à l'utilisation de la macro, le logiciel calcule l'intensité des immunomarquages d'alpha-synucléine présent dans le carré sélectionné et le nombre total de

cellules neuronales. Grâce aux données chiffrées données, nous supprimons les immunomarquages non spécifiques (souvent inférieur à 10 pixels) puis nous calculons la quantité en pourcentage d'alpha-synucléine présente dans ce carré sélectionné dans les régions lésées choisis. Tous les animaux de l'expérimentation d'exposition par eau de boisson au paraquat ont été soumis à ce protocole de comptage puis répertoriés dans un graphique pour vérifier le potentiel effet du paraquat dans les animaux exposés à cet herbicide.

Résultats

Le modèle de souris transgéniques M83 : étude de la pathologie spontanée au cours du vieillissement ou accélérée par inoculation d'alpha-synucléine agrégée

Au début de mes travaux en 2017, la caractérisation lésionnelle dans le modèle transgénique M83 restait peu étudiée par immunohistochimie dans le laboratoire. A cette époque, les travaux portaient essentiellement sur la caractérisation biochimique de l'alpha-synucléine. Bien que l'objectif initial de mes travaux visait à identifier des modifications post-traductionnelles éventuelles de la protéine associée à une exposition au paraquat chez la souris M83, l'étude lésionnelle des souris M83 présentant une paralysie du train arrière s'est révélée précieuse pour identifier de telles modifications post-traductionnelles représentatives de l'alpha-synucléine pathologique et mieux comprendre la progression de la pathologie. Ces travaux permettent aussi l'utilisation et la vérification de la spécificité des anticorps dirigés contre ces différentes modifications post-traductionnelles possibles et d'améliorer leur analyse et l'interprétation des résultats obtenus. Nous présenterons ainsi les éléments de caractérisation dans ce modèle M83, lors de son vieillissement ou dans des conditions expérimentales dans lesquelles le développement de la maladie est accéléré par des injections d'extraits cérébraux pathologiques (66) (49) ou plus récemment l'injection de produits d'amplification in vitro (51).

- I. Modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine lors du vieillissement chez la souris M83
 - a. Phosphorylation sur la sérine 129 de l'alpha-synucléine

La phosphorylation au niveau de la sérine 129 représente la principale modification post-traductionnelle au titre du marqueur spécifique de la pathologie des synucléinopathies, et nous disposons de différents anticorps commerciaux permettant de l'identifier (voir Matériel et méthodes, Tableau 2).

i. Localisation de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129

J'ai retenu dans un premier temps l'anticorps Ab51253 (Abcam) dont l'utilisation a été documentée dans des travaux publiés en biochimie (66) (51). Dans le modèle M83, lors de l'apparition de signes cliniques de paralysie, qui lors du vieillissement apparaissent à partir de l'âge de 10 mois (cet âge pouvant être relativement variable entre individus) les dépôts intracellulaires d'alpha-synucléine phosphorylée sont principalement présents dans les parties postérieures du cerveau, dans les régions du tronc cérébral, du thalamus et du mésencéphale, ainsi que dans la moelle épinière (28) (Figure 15).

Il existe une importante quantité d'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 qui se présente sous la forme d'inclusions intra-cytoplasmiques ou dans les prolongements neuronaux (Figure 16), rappelant les corps et neurites de Lewy, lésions caractéristiques de la maladie de Parkinson ou de la démence à corps de Lewy. Leur distribution est illustrée dans la figure 16, montrant la localisation des immunomarquages (points rouges) sur une coupe sagittale du cerveau d'une souris M83 avec une paralysie du train arrière, dont la densité dans chacune des régions neuro-anatomiques reflète la quantité de protéine phosphorylée présente (Figure 16).

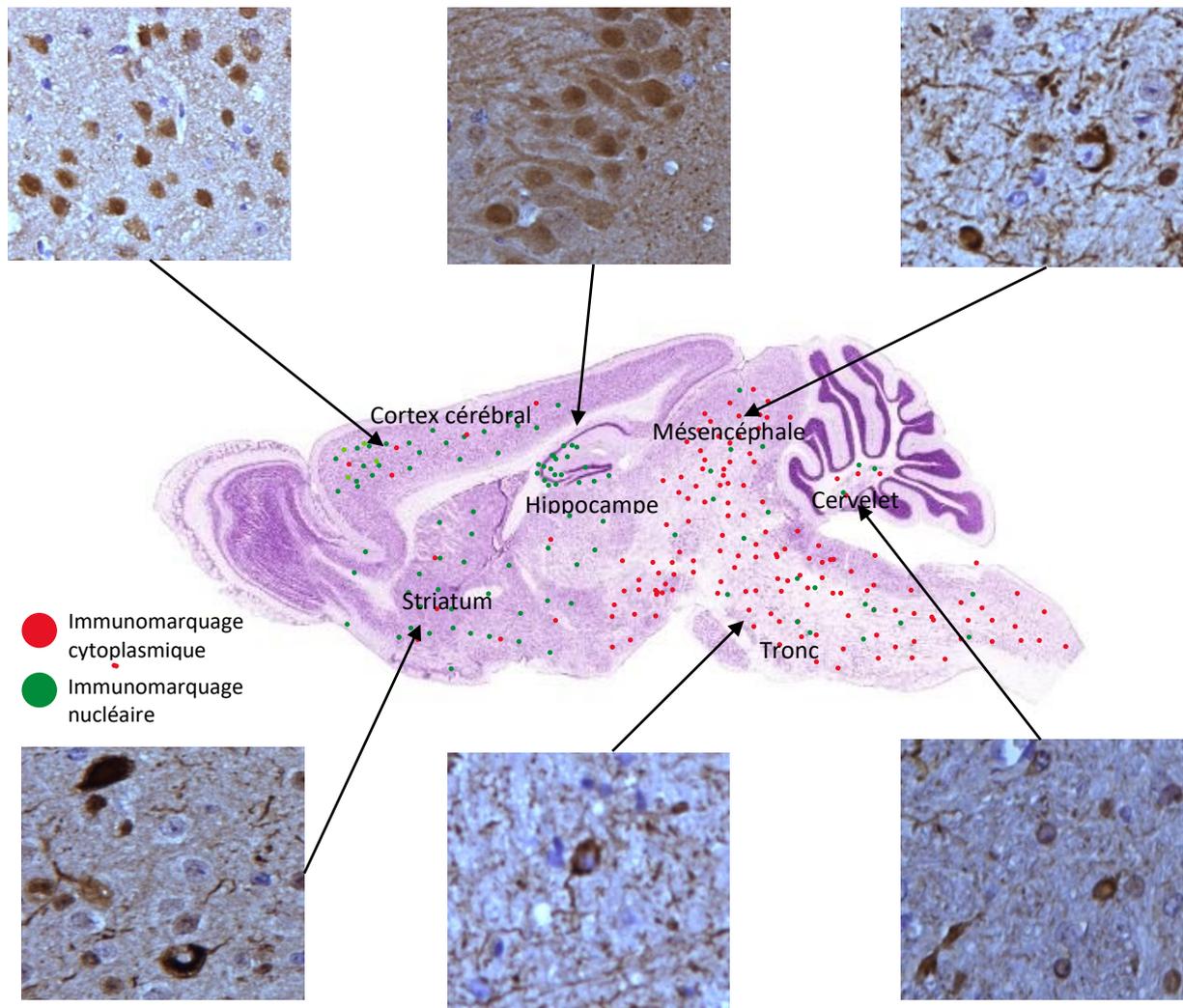


Figure 16: Localisation de l'alphasynucléine phosphorylée en sérine 129 dans le cerveau d'une souris M83 paralysée du train âgée de 1 an.

Il existe une quantité importante d'immunomarquages intra-cytoplasmiques et des neurites dans la partie postérieure du cerveau en particulier dans le tronc cérébral, le mésencéphale, le thalamus, et le striatum, ainsi que dans les noyaux profonds du cervelet. Ces immunomarquages sont observés de façon beaucoup plus éparse dans le cortex cérébral. Dans les régions antérieures, l'hippocampe et le cortex cérébral, on observe également des immunomarquages nucléaires, qui sont en particulier très bien identifiables dans la couche pyramidale de l'hippocampe. Echelle : 20µm

Au niveau de certaines régions cérébrales comme le cortex cérébral, la présence d'agrégats sous forme d'inclusions intra-cytoplasmiques ou dans les prolongements neuronaux est en revanche limitée, par comparaison aux régions postérieures, en particulier le mésencéphale et le tronc cérébral.

La région neuro-anatomique qui se distingue particulièrement est l'hippocampe, on note ainsi une localisation nucléaire des immunomarquages, et de façon diffuse et moins intense un

immunomarquage des cytoplasmes et des prolongements neuronaux, tout particulièrement au niveau de la couche des cellules pyramidales. Toutefois, aucun immunomarquage sous forme d'inclusions intra-cytoplasmiques n'est identifié. Enfin des immunomarquages nucléaires sont également observés de façon plus éparse dans le cortex cérébral. La distribution des marquages nucléaires est schématisée sur la coupe sagittale de cerveau dans la figure 16, représentés sous forme de points verts.

ii. Spécificité de détection des immunomarquages de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129

Nous avons utilisé deux autres anticorps différents afin de vérifier la spécificité des résultats obtenues avec Ab51253 et d'évaluer si les mêmes types de marquage sont retrouvés avec les deux autres anticorps. Ayant observé des immunomarquages nucléaires rarement décrits dans la littérature, nous nous sommes en effet interrogés sur leurs possibilités de reconnaissance par différents anticorps et leur signification (ou non) dans la pathologie des souris M83.

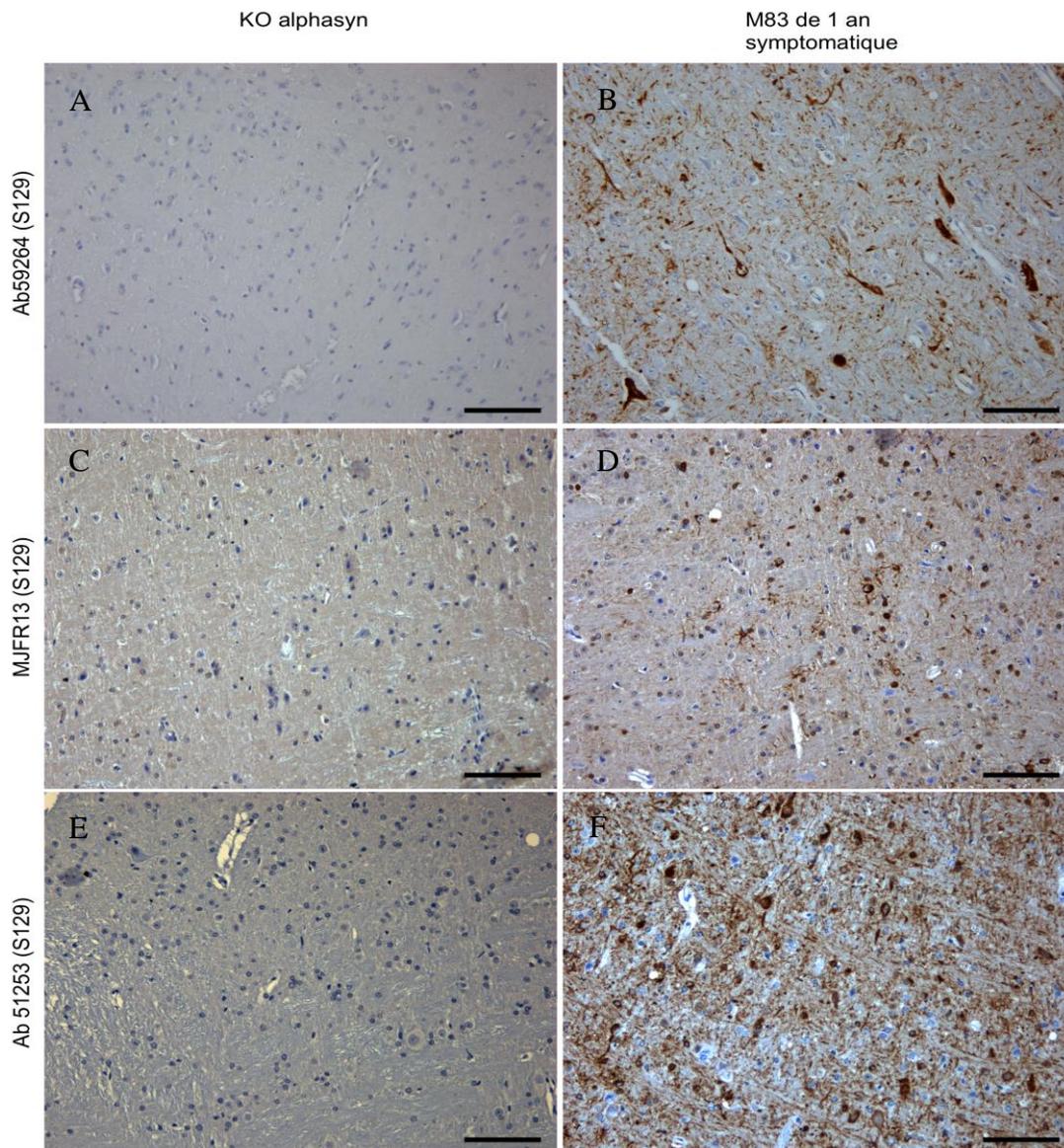


Figure 17 : Comparaison de la détectabilité de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 avec trois anticorps monoclonaux de lapin dans le tronc cérébral de la souris M83 paralysée du train arrière

(A, C, E) chez une souris n'exprimant pas l'alpha-synucléine de souris (témoin négatif), aucun marquage n'est observé montrant l'absence de marquage non spécifique,

(B, D, F) dans le tronc cérébral d'une souris M83 symptomatique, on note la présence d'immunomarquages cytoplasmiques et des neurites en quantité et de tailles différentes. Ab51253

(F) révèle de multiples marquages plus abondants qu'avec les deux autres anticorps Ab59264 et MJFR13.

Barre d'échelle = 50 μ m

Pour compléter mes recherches, mes deux autres choix se sont portés sur MJFR13 et Ab59264 (Figure 17). L'utilisation de Ab59264 a déjà été décrite chez les souris M83 (51) (42) mais les études ne parlaient pas de la présence de ces marquages nucléaires et périnucléaires que nous

décrivons dans ce travail. L'anticorps MJFR13 contrairement à Ab59264 n'a pas encore été publié à ma connaissance sur le modèle M83.

Les immunomarquages obtenus avec les trois anticorps utilisés sont considérés comme étant spécifiques de l'expression de l'alpha-synucléine, au vu de l'absence totale d'immunomarquages chez les souris C57B6 KO alpha-synucléine (Figure 17). Toutefois, les deux anticorps (MJFR13 et Ab59264) ne révèlent pas nécessairement les mêmes immunomarquages que ceux que nous avons décrit avec l'anticorps Ab51253 chez la souris M83 paralysée du train arrière en termes de localisation subcellulaire :

- MJFR13 détecte les mêmes immunomarquages (nucléaires, périnucléaires, intracytoplasmiques et des prolongements neuronaux) que ceux que nous avons décrit avec Ab51253
- A l'inverse Ab59264 ne détecte pas les immunomarquages nucléaires et périnucléaires mais seulement les immunomarquages intracytoplasmiques et les prolongements neuronaux.

Pour la suite de nos travaux nous avons utilisés uniquement l'anticorps Ab51253, déjà utilisé dans plusieurs publications (51) (66) (67) (19) (76). Cet anticorps est utilisé en routine au laboratoire pour détecter l'alpha-synucléine phosphorylée par les techniques biochimiques (ELISA/Western blot) (76). Je souhaitais ainsi évaluer son intérêt pour étudier de façon plus approfondie par la technique d'immunohistochimie la pathologie chez les souris M83.

iii. Evaluation des immunomarquages en fonction de l'âge et de la pathologie chez la souris M83

Dans la figure 18, les immunomarquages observés avec l'anticorps Ab51253 à différents âges chez des souris M83 ou/et en présence d'une paralysie du train arrière chez une souris (âgée

d'un an) sont illustrées, en comparaison avec des souris M83 âgées de 2, 8, 10 et 16 mois sans paralysie du train arrière.

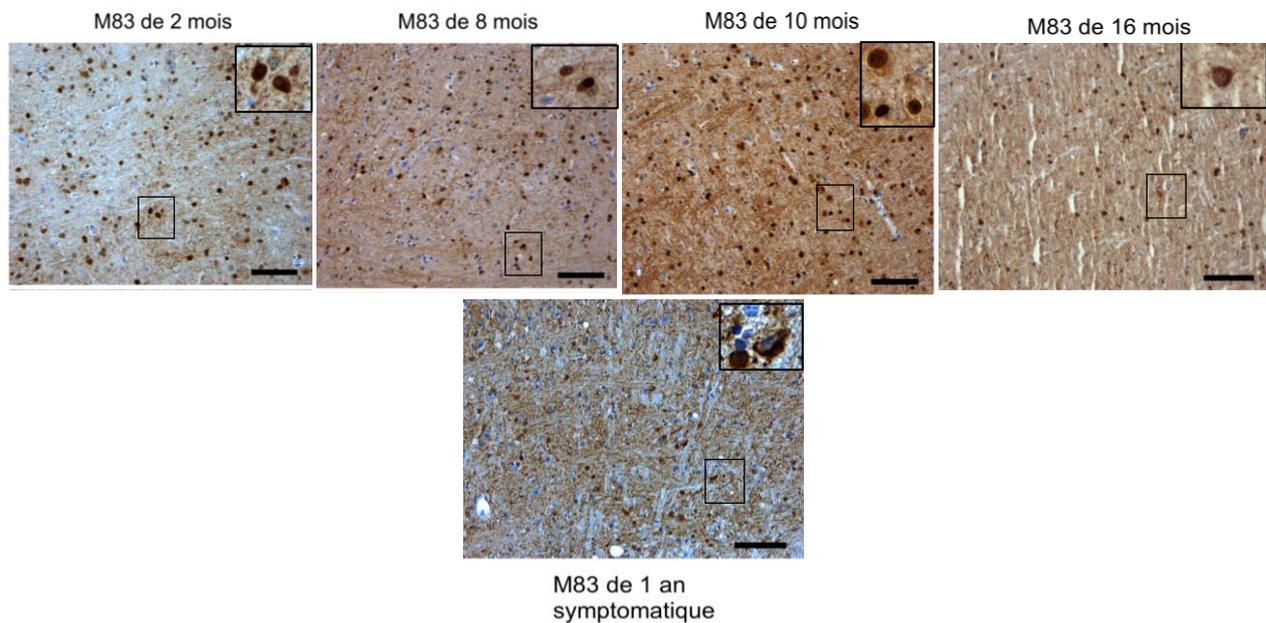


Figure 18 : Détection de l'alpha-synucléine phosphorylée sur la sérine 129 pathologique (Abcam Ab51253) chez la souris M83 au niveau du tronc cérébral et à des âges différents. Barre d'échelle = 50µm

A l'âge de 2 mois, la souris montre des marquages de l'alpha-synucléine phosphorylée dans les noyaux des cellules. A 8 et 10 mois, des immunomarquages nucléaires et une coloration diffuse du neuropile sont observés. Chez la souris de 1 an symptomatique, les immunomarquages sont cytoplasmiques et dans les neurites, alors que chez une souris de 16 mois asymptomatique, on observe des inclusions périnucléaires nettes sur l'ensemble du tronc cérébral

Dans l'étude, seule la souris présentant une paralysie du train arrière montre les lésions typiques de la maladie M83. La souris de 16 mois, sans symptomatologie manifeste, montre uniquement des marquages périnucléaires. (Figure 18). A 2 mois, on observe un immunomarquage des noyaux et un immunomarquage du neuropile diffus (absents chez la souris C57Bl KO ils pourraient rappeler les marquages présynaptiques décrits par Tanji et al., 2010). A 8 et 10 mois, l'alpha-synucléine phosphorylée reste présente dans le noyau mais on observe également dans certaines cellules une localisation périnucléaire des immunomarquages. En ce qui concerne, la souris avec une paralysie du train arrière (12 mois), on observe des immunomarquages de la forme phosphorylée de l'alpha-synucléine intra-cytoplasmiques et dans les prolongements

neuronaux. Il est à noter que chez une souris plus âgée (16 mois) mais ne présentant pas de signes cliniques manifestes, la présence de marquages périnucléaires est observée, mais pas sous forme d'inclusions intra-cytoplasmiques ou dans les prolongements neuronaux (Figure 18).

L'ensemble des observations réalisées nous permet ainsi de proposer schématiquement différents critères fondés sur la localisation sub-cellulaire des immunomarquages par l'anticorps Ab51253, illustré dans la figure 19 :

- Stade 1 : inclusions nucléaires nette. Ce sont les seuls marquages présents chez les souris avant l'âge de 3 mois,
- Stade 2 : inclusion périnucléaire des immunomarquages, observés chez des animaux de 7 à 10 mois,
- Stade 3 : immunomarquage intra-cytoplasmique net,
- Stade 4 : Les dépôts intra-cytoplasmiques accompagnés de marquages importants des prolongements neuronaux sont abondants, lorsque la souris est sacrifiée avec une paralysie du train postérieur caractérisée, alors qu'en l'absence de signes cliniques manifestes les immunomarquages restent de localisation nucléaire ou périnucléaire.

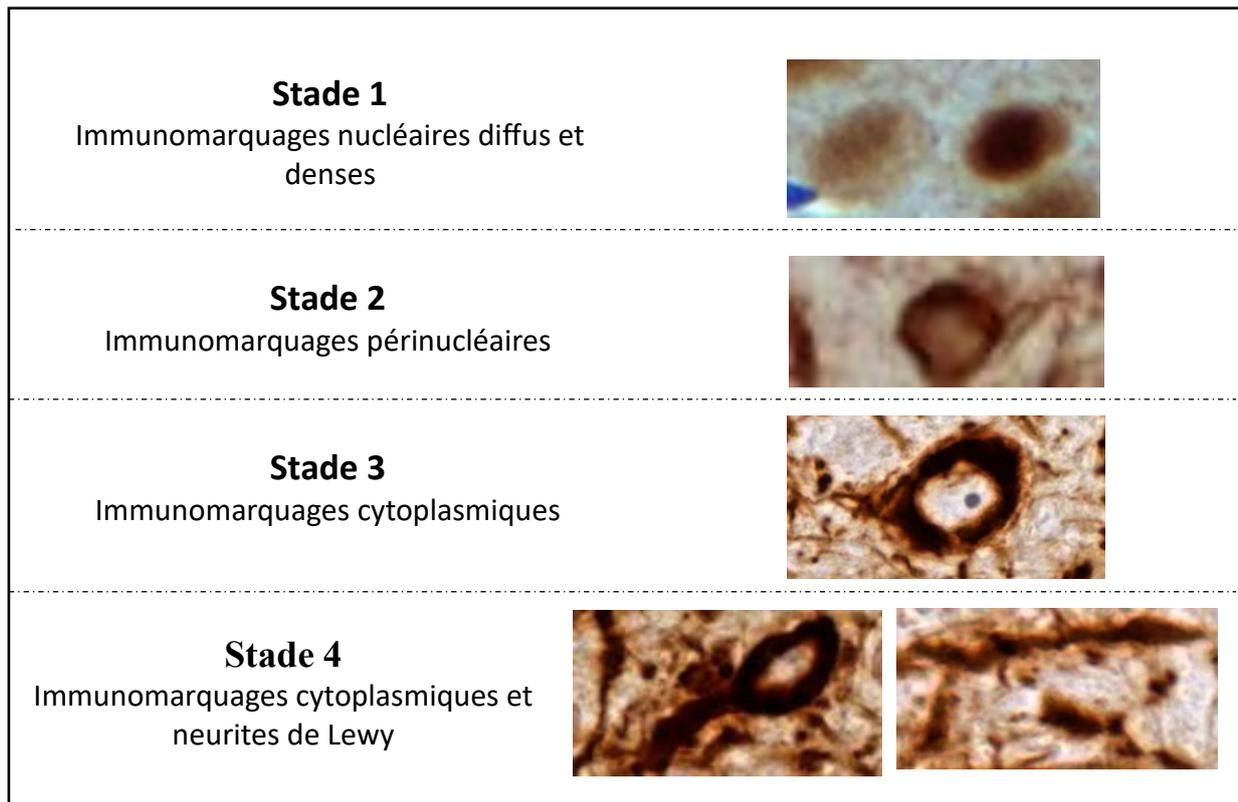


Figure 19 : Critères de caractérisation lésionnelle chez la souris M83 par identification de la localisation sub-cellulaire des immunomarquages

Chaque type d'immunomarquage présenté pourrait représenter une étape dans la progression de la pathologie neuronale de la souris M83. Le premier stade montre des immunomarquages nucléaires présents y compris chez la souris jeune. Au second stade, les immunomarquages sont observés avec une localisation périnucléaire. Les deux derniers stades montrent un immunomarquage présent dans la partie cytoplasmique et dans les neurites. Barre d'échelle : 50 μ m

b. Résistance de l'alpha-synucléine phosphorylée à la protéinase K

La résistance à la digestion par les protéases constitue un critère important et souvent utilisé de caractérisation de l'agrégation protéique.

Sur la figure 20, on peut observer l'effet d'un traitement des coupes tissulaires par la protéinase K à 10 μ g/ml pendant 20 minutes sur les immunomarquages par l'anticorps Ab51253 dirigé contre l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 au niveau du tronc cérébral chez une souris M83 paralysée du train arrière ou une souris M83 jeune (2 mois).

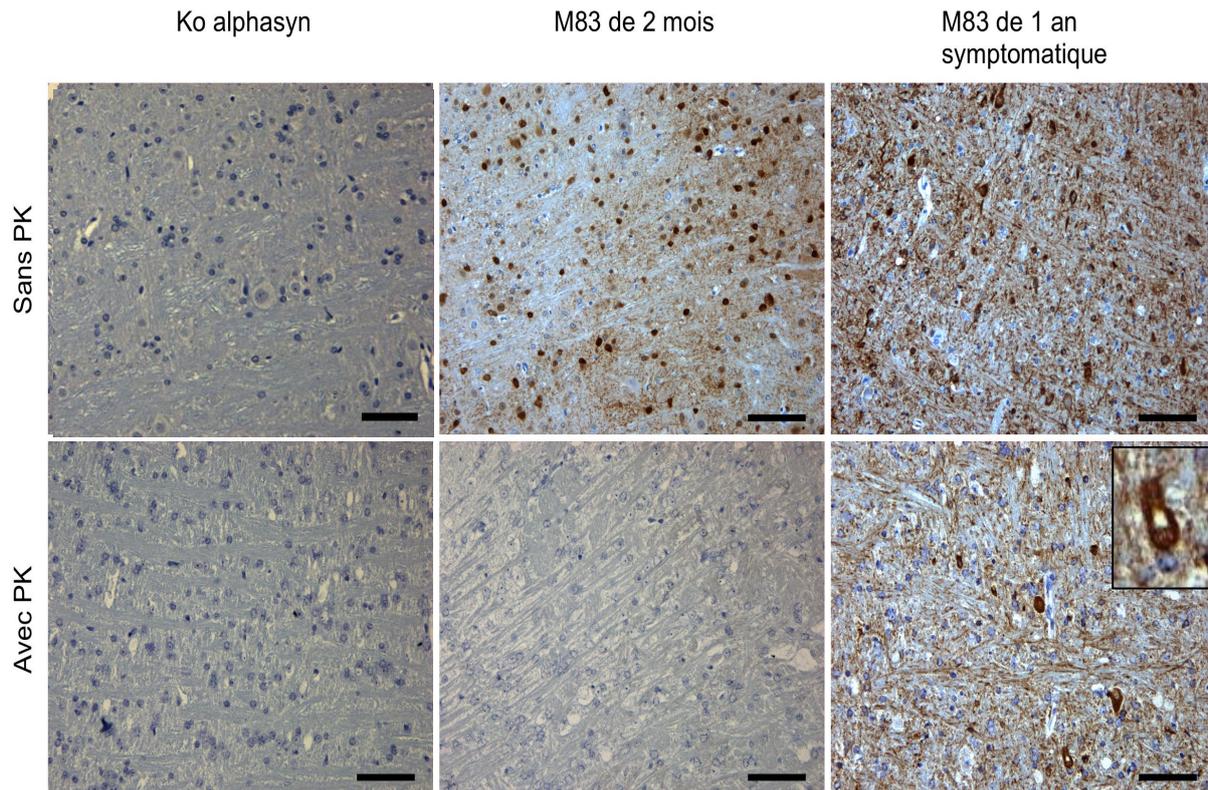


Figure 20 : Mise en évidence de la résistance à la protéinase K de l'alpha-synucléine phosphorylée (Ab51253) dans le tronc cérébral de la souris M83 paralysée du train arrière

Après traitement des coupes tissulaires par la protéinase K, l'alpha-synucléine phosphorylée est totalement digérée chez la souris jeune (2 mois). Chez la souris M83 paralysée du train arrière on observe en revanche une résistance importante à la protéinase K des immunomarquages intracytoplasmiques et des neurites. Dans le petit encadré de la souris symptomatique en contact avec la protéinase K, il est représenté un immun marquage situé au niveau du cytoplasme, le marquage nucléaire disparaît. Barre d'échelle = 50 µm

En l'absence de protéinase K, comme précédemment décrit, des immunomarquages nucléaires et du neuropile diffus sont observés. Après traitement par la protéinase K, ces marquages ne résistent pas au traitement enzymatique, suggérant, en cela, que l'alpha-synucléine n'est pas présente sous forme d'agrégats protéiques (Figure 20).

Chez la souris M83 (1 an) symptomatique sont observées des immunomarquages de localisation nucléaire, périnucléaire, intra-cytoplasmique et des prolongements neuronaux. Après traitement par la protéinase K, seuls les immunomarquages intra-cytoplasmiques et des prolongements neuronaux restent clairement observés dans les parties postérieures du cerveau, des

immunomarquages révèlent la possible agrégation de l'alpha-synucléine de manière intéressante.

c. Recherche de modifications post-traductionnelles par nitration

Nous avons souhaité évaluer la possibilité de détecter une seconde modification post-traductionnelle qui a été identifiée dans un nombre d'études beaucoup plus limité, la nitration de l'alpha-synucléine (54) (43). Nous avons en particulier cherché à utiliser l'anticorps Nsyn14 (27) (54) dont la spécificité est intéressante car il ne reconnaît pas l'alpha-synucléine non nitrée, confirmant sa spécificité vis-à-vis de la nitration de l'alpha-synucléine.

J'ai recherché la présence d'immunomarquages :

- i) Dans le modèle M83 au travers de multiples conditions expérimentales pour le démasquage de la protéine (physiques/ chimiques)
- ii) Le choix de l'anticorps primaire
- iii) Le choix du système de révélation (amplification signal)

A titre d'exemple représentatif, les résultats sont illustrés dans l'une de ces conditions expérimentales examinées (Figures 21) pour une souris M83 paralysée du train arrière et d'une souris jeune de 2 mois dans deux régions neuro-anatomiques : le tronc cérébral (siège principal des lésions contenant l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 comme indiqué précédemment) et le cervelet (région où les lésions sont très peu abondantes). Globalement, dans toutes les conditions étudiées, nous avons observé un marquage strictement localisé au niveau des structures vasculaires, également présent chez la souris C57Bl/6 KO alpha-synucléine, indiquant ainsi, la présence d'une fixation non spécifique de l'anticorps (Figure 21).

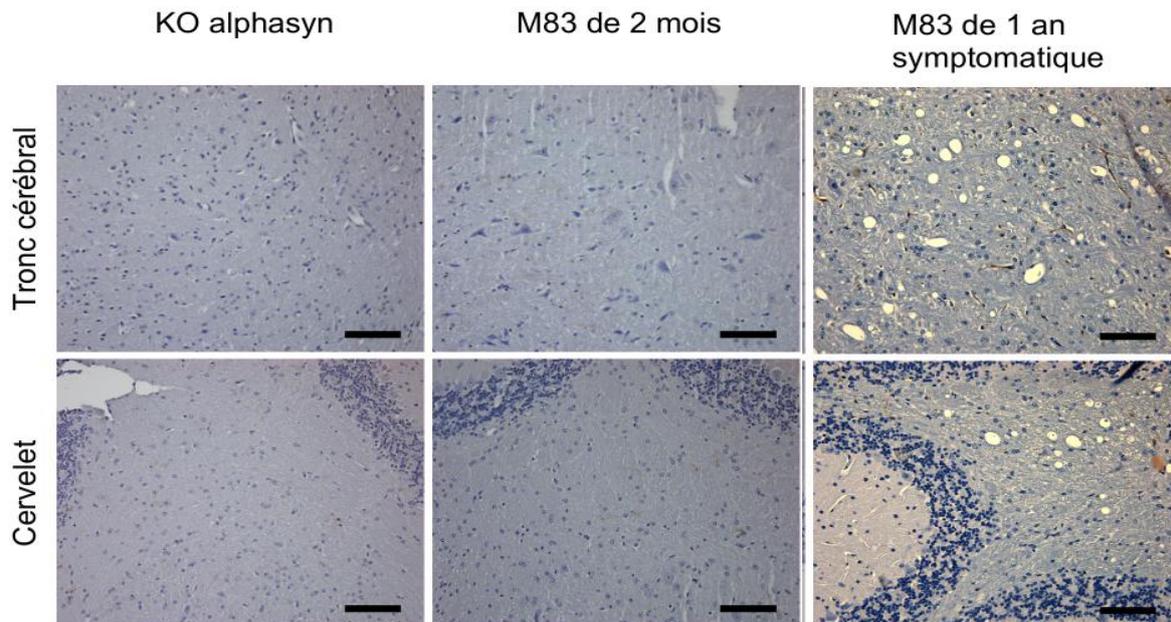


Figure 21 : Essai de détection de l'alpha-synucléine nitrée en tyrosine 39 par l'anticorps nSyn14 (Merck) par immunohistochimie dans le tronc cérébral et le cervelet de la souris M83

Aucune immunoréactivité n'est observée, y compris après une exposition pendant 8 mois au paraquat par voie orale. La souris M83 malade ne montre également aucun marquage avec cet anticorps. Barre d'échelle = 50 μ m

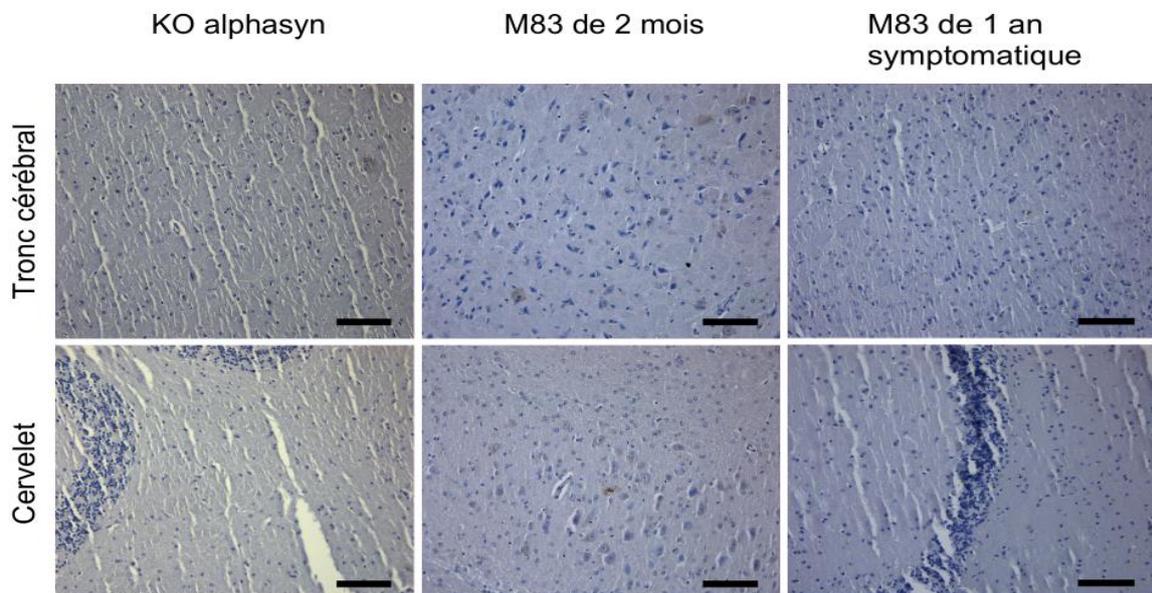


Figure 22 : Essai de détection de formes nitrées totales (3-Nitrotyrosine) dans le tronc cérébral et le cervelet chez la souris M83

On observe une absence complète d'immunomarquage, qui pourrait résulter de la nitration des protéines présentes dans le tissu cérébral avec l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la 3-nitrotyrosine, y compris chez une souris M83 exposée au paraquat par voie orale pendant 8 mois ou chez une souris M83 âgée d'un an et symptomatique. Barre d'échelle = 50 μ m

Pour compléter cette approche, j'ai utilisé un autre anticorps pouvant détecter toutes les protéines nitrées. Cet anticorps dirigé contre la 3-Nitrotyrosine ne détecte pas que l'alpha-synucléine nitrée (Figure 22). Comme précédemment nous n'avons cependant observé (Figure 21-22) aucun immunomarquage, y compris dans le tronc cérébral d'une souris M83 symptomatique.

II. Pathologie chez la souris M83 après injection d'un extrait cérébral de souris M83 malade

Pour caractériser par immunohistochimie la pathologie chez la souris M83 après injection d'un extrait cérébral de souris M83 malade, nous avons analysé les prélèvements provenant d'une étude publiée en 2017 dans laquelle certains animaux avaient été analysés à l'aide de méthodes biochimiques. Ces expérimentations ont été réalisées par injection d'un homogénat préparé avec un cerveau de souris M83 paralysée du train arrière chez des nouveaux nés. A la naissance, les souriceaux ont été inoculés soit par voie intra-cérébro-ventriculaire (ICV) (2 μ l d'homogénat à 5% par souris), soit par voie intra-péritonéale (IP) (50 μ l d'homogénat à 10 %). Les animaux ont été suivis jusqu'au développement d'une paralysie du train arrière.

Les figures 23, 24 et 25 montrent les immunomarquages réalisés avec l'anticorps Ab 51253 sur des cerveaux prélevés chez des animaux (homozygote/hémizygote) inoculés puis sacrifiés lors de la paralysie du train arrière. Comme décrit précédemment, chez une souris M83 présentant une paralysie du train arrière lors du vieillissement, des immunomarquages sous forme d'inclusions intra-cytoplasmiques et des prolongements neuronaux sont observés en abondance dans le tronc cérébral et dans le mésencéphale, par les deux voies d'inoculation pour les deux génotypes étudiés. Par ailleurs, nous observons une diminution du marquage du neuropile à l'avant du cerveau en comparaison aux souris développant une paralysie du train arrière lors de leur vieillissement.

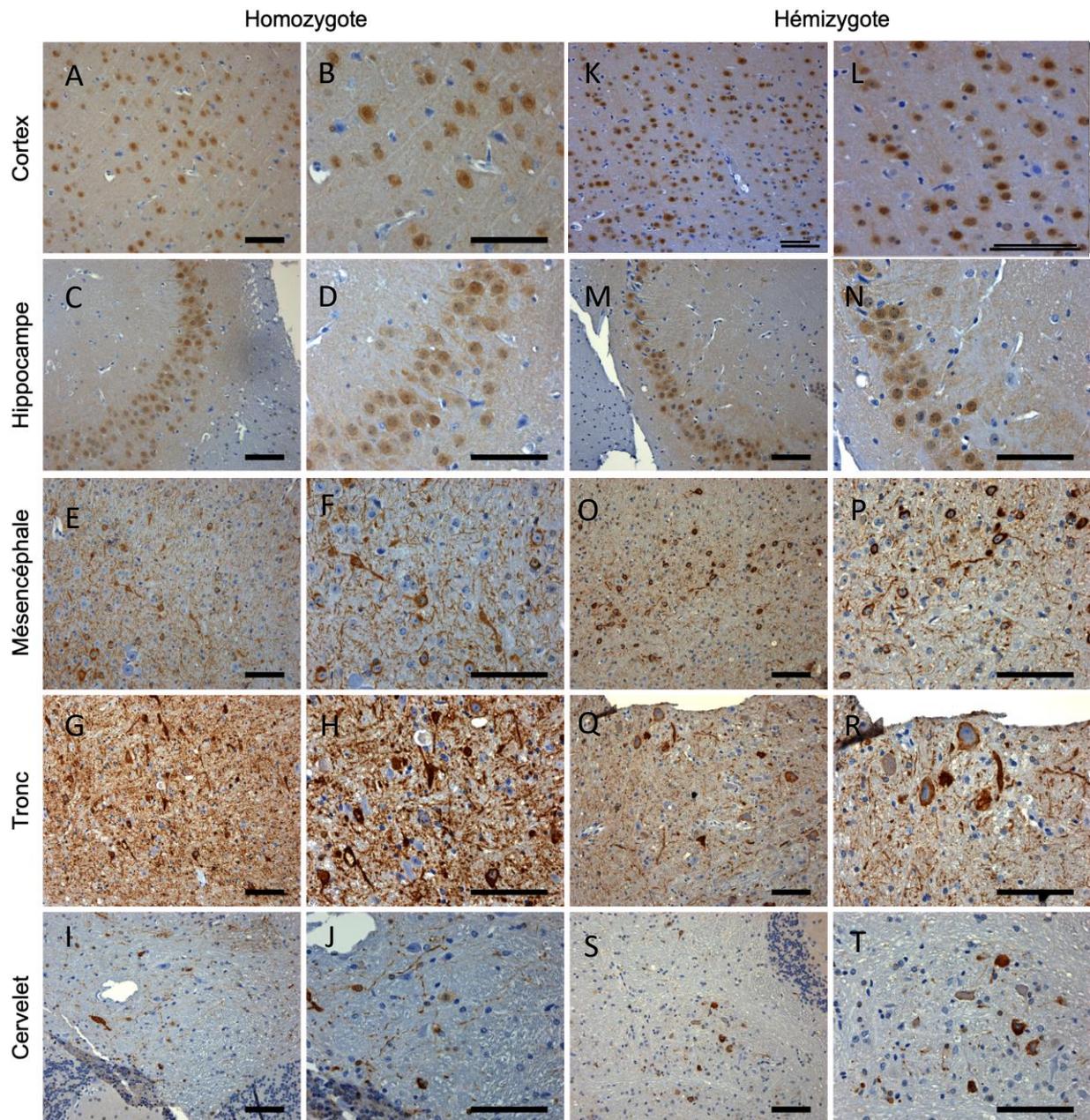


Figure 23 : Distribution de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 homozygote ou hémizygote pour l'alpha-synucléine après une inoculation d'extrait cérébral de souris M83 malade par voie intra-cérébroventriculaire.

A-B, K-L Prédominance des immunomarquages nucléaires dans le cortex cérébral, en particulier chez les animaux hémizygotés (K-L), avec une très faible quantité d'immunomarquages cytoplasmiques dans cette région cérébrale,

C-D, M-N Immunomarquages nucléaires et cytoplasmiques diffus dans la couche pyramidale de l'hippocampe,

E-H, O-R Des immunomarquages cytoplasmiques et des neurites prédominants dans le mésencéphale et le tronc cérébral, en plus grande quantité chez les animaux homozygotés,

I-J, S-T Des dépôts peu abondants d'alpha-synucléine phosphorylée sous la forme cytoplasmique dans le cervelet ; des prolongements immunomarqués sont plus abondants dans le cervelet chez les animaux homozygotés que chez les animaux hémizygotés.

Echelle : A, C, E, G, I, K, M, O, Q et S à 50 µm ; B, D, F, H, J, L, N, P, R et T à 20 µm

Ainsi à un âge moins avancé, les souris M83 homozygote (7 mois en IC, 14 mois en IP) et hémizygote (10 mois en IC, 17 mois en IP) pour l'alpha-synucléine présentent les mêmes immunomarquages (nucléaire, cytoplasmique) mais en quantité différente. Dans le cortex et l'hippocampe, il existe une prédominance des immunomarquages nucléaires quel que soit le type d'inoculation. Les immunomarquages cytoplasmiques sont plus importants dans les régions postérieures des souris homozygotes que celle hémizygotés.

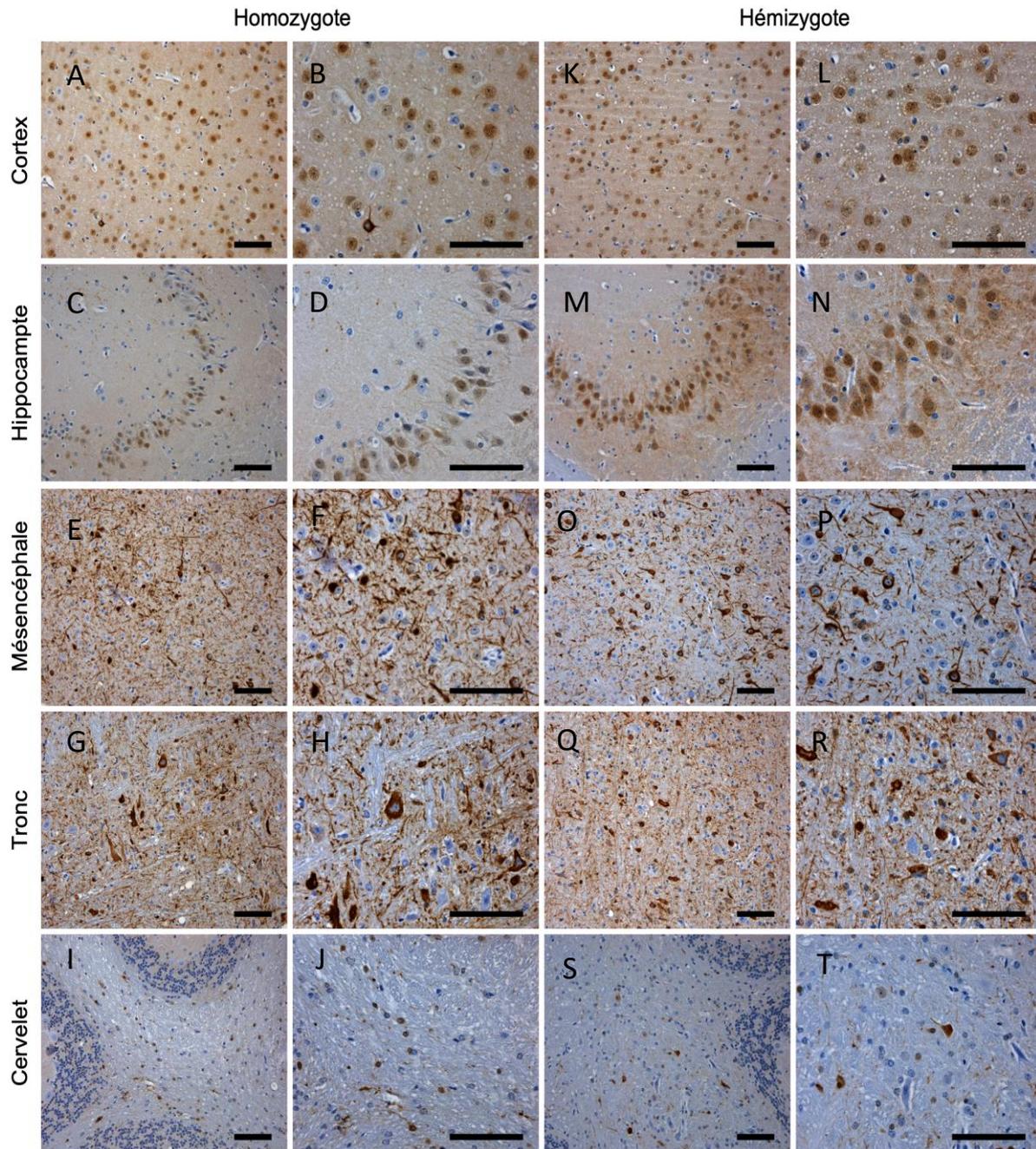


Figure 24 : Distribution de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 homozygote ou hémizygote après une inoculation d'extrait cérébral de souris M83 malade par voie intra-péritonéale

A-B, K-L Des immunomarquages nucléaires sont observés dans le cortex cérébral, avec quelques immunomarquages cytoplasmiques dans cette région,

C-D, M-N Des immunomarquages nucléaires sont présents dans la couche pyramidale de l'hippocampe, surtout abondants chez les animaux hémizygotes

E-H, O-R Des immunomarquages cytoplasmiques importants ainsi que des neurites, en plus grande quantité chez les animaux homozygotes que chez les animaux hémizygotes.

I, J, S, T Des dépôts moins abondants d'alpha-synucléine phosphorylée présents dans le cervelet

Echelle : A, C, E, G, I, K, M, O, Q et S sont à 50 µm ; B, D, F, H, J, L, N, P, R et T sont à 20 µm

III. Pathologie chez la souris M83 après injection d'un produit d'amplification *in vitro* de l'alpha-synucléine agrégée

Nous avons enfin étudié par immunohistochimie le cerveau de souris M83 inoculées par stéréotaxie dans le striatum d'un produit d'amplification (« amplicon ») obtenu par des cycles de sonication-incubation d'un homogénat de cerveau de souris M83 jeune. L'application de ce procédé montrait la présence d'agrégats d'alpha-synucléine, identifiables par la présence de dimères abondants en Western blot, et le développement rapide de signes cliniques de paralysie après inoculation intra-striatale d'un tel produit d'amplification (53).

Les résultats obtenus par immunohistochimie illustrés par la figure 25 montrent des immunomarquages intra-cytoplasmiques et des prolongements neuronaux très abondants et intenses dans le tronc cérébral. Comme observé chez des souris M83 présentant une paralysie du train arrière lors du vieillissement. De façon intéressante, on observe également, en plus de la diminution du marquage du neuropile à l'avant du cerveau comme chez les souris M83 inoculé avec des homogénats de cerveau de souris paralysées ; une densification des immunomarquages nucléaires ainsi que la présence d'un immunomarquage cytoplasmique dense dans le cortex. Enfin, le cervelet présente lui aussi un marquage cytoplasmique dense beaucoup plus important étudié par comparaison aux animaux précédemment étudiés (figure 26).

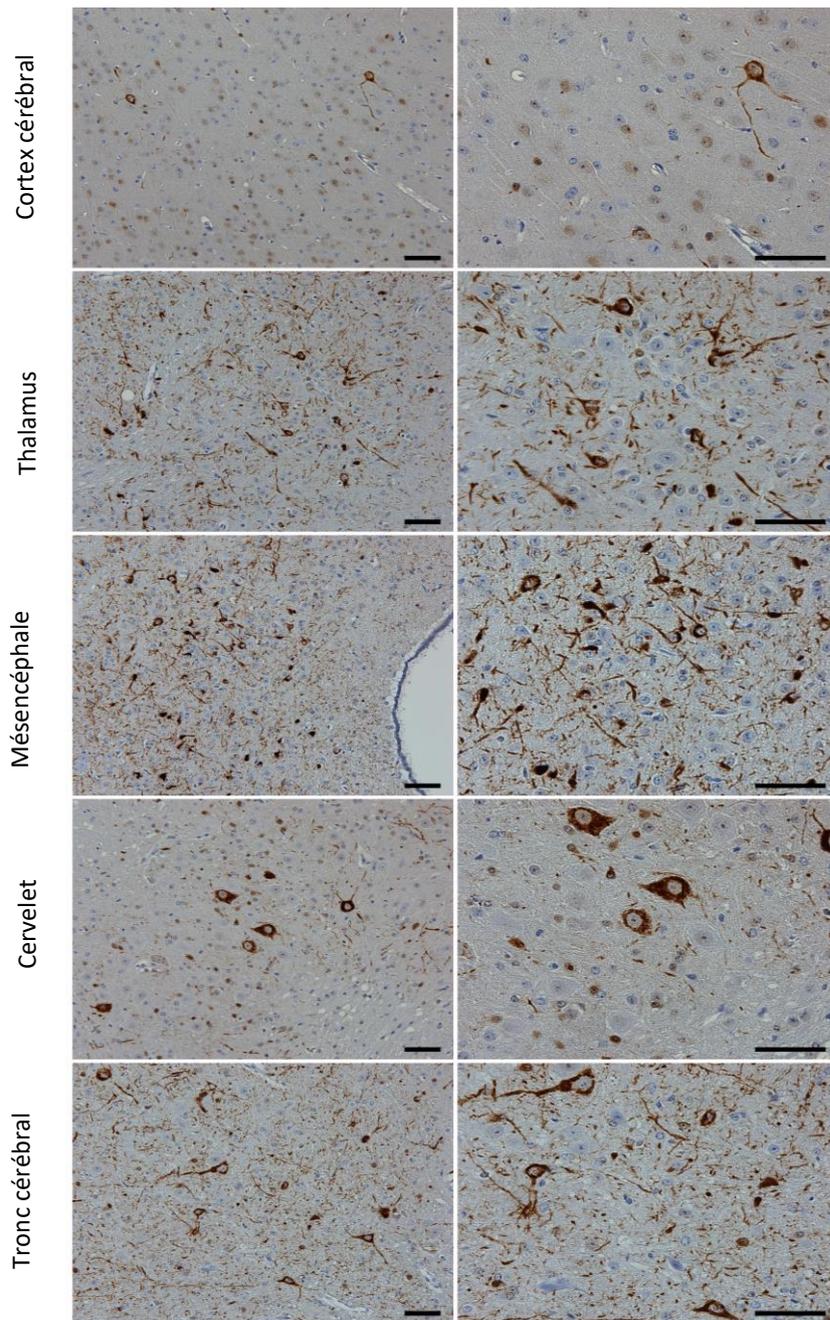


Figure 25 : Distribution de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 inoculée par voie intra-striatale par un produit d'amplification in vitro de cerveau de souris M83

Seule des immunomarquages intra-cytoplasmiques et des prolongements neuronaux très bien identifiables sont observés chez ces souris avec une absence de coloration du neuropile ou des noyaux cellulaires. Ces immunomarquages sont observés dans l'ensemble des régions cérébrales connues pour présenter des lésions au cours du vieillissement (voir figure 1) y compris, bien que de façon plus éparse, dans le cortex cérébral. Barres d'échelle = 50µm

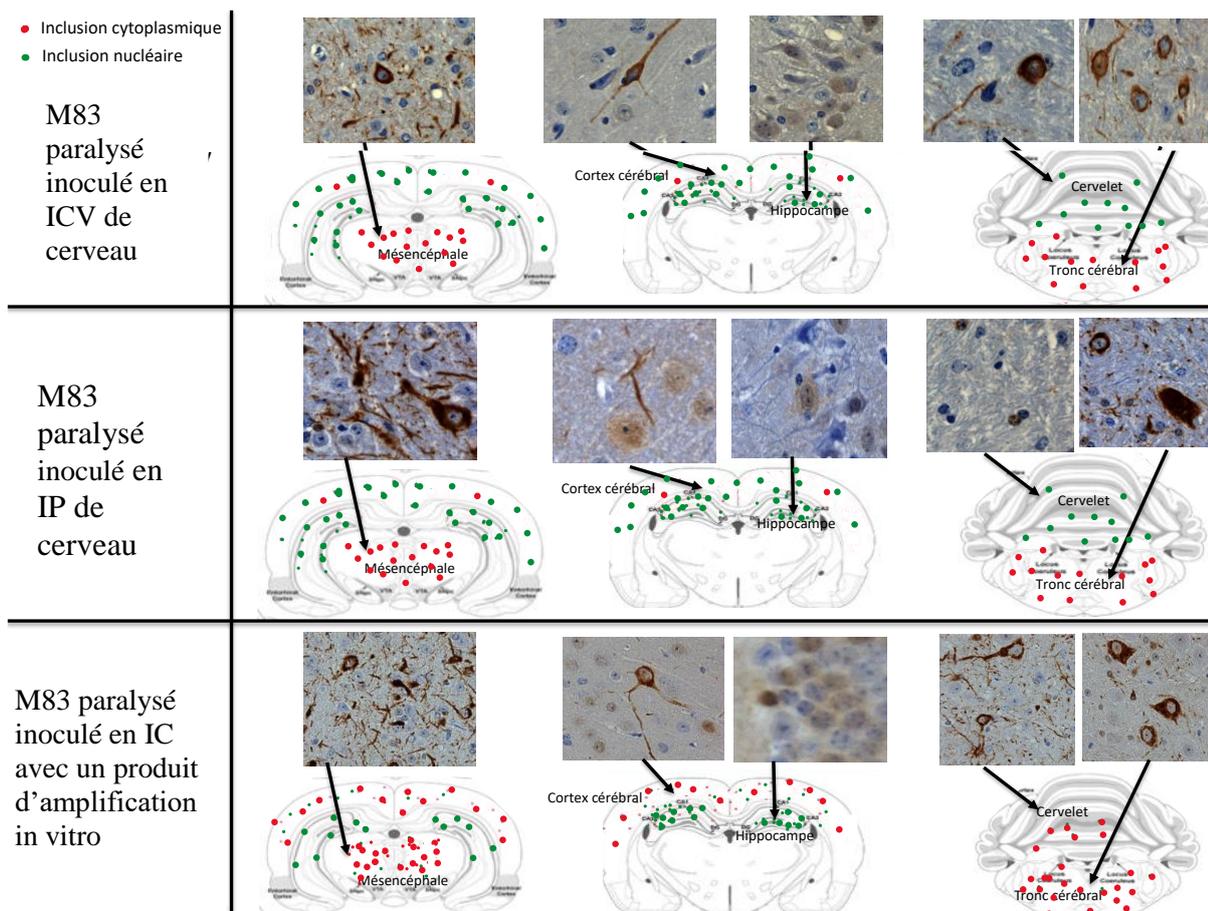


Figure 26 : Comparaison des immunomarquages et localisation de l'alpha-synucléine phosphorylée dans le cerveau de souris M83 inoculées par différentes stratégies expérimentales Barres d'échelle = 20µm

IV. Recherche de modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine chez la souris M83 après exposition chronique au paraquat

a. Recherche de la phosphorylation en sérine 129

Pour évaluer l'effet d'une exposition au paraquat sur l'alpha-synucléine phosphorylée dans le modèle transgénique M83, j'ai étudié des souris exposées au paraquat via l'eau de boisson à une dose estimée à environ 10 mg/kg/jour pendant 6 à 8 semaines. Dans certaines souris, il a été décrit une modification de l'alpha-synucléine phosphorylée uniquement dans le système nerveux entérique (51). Pour compléter ce travail, j'ai recherché par IHC, pour d'éventuelles modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine phosphorylée dans le cerveau des souris exposés de façon chronique au paraquat pendant 6 ou 8 mois.

La figure 27 montre les résultats obtenus au niveau du tronc cérébral, de l'hippocampe et du cortex cérébral pour les deux durées d'exposition réalisées. Nous observons un marquage important du neuropile ainsi que la présence d'immunomarquages nucléaires et périnucléaires dans les trois régions cérébrales étudiées. Ces marquages ont une densité plus importante que ceux observés chez les animaux contrôles (non exposés au paraquat). En particulier, au niveau de l'hippocampe, les immunomarquages nucléaires, particulièrement bien identifiés au niveau de la couche pyramidale, sont accompagnés d'un marquage moins intense mais bien visible des prolongements cellulaires, définissant de façon nette l'organisation de cette couche particulière. Il est important de souligner que ces animaux sont âgés de 8 ou 10 mois, ce qui représente d'après la publication originelle (28) l'âge à partir duquel peuvent se manifester des signes cliniques de paralysie lors du vieillissement des souris M83, qui peut cependant être très variable selon les individus. Cependant, aucun immunomarquage intra-cytoplasmique ou/et des prolongements neuronaux tels que nous avons pu les décrire précédemment sur les souris M83 paralysées du train arrière n'est observé.

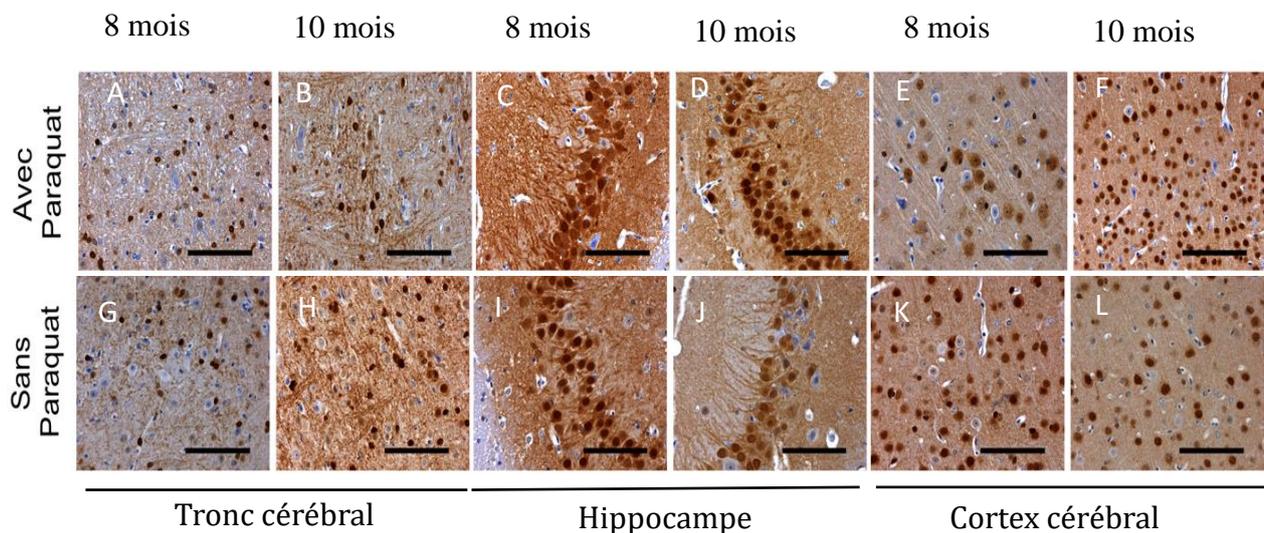


Figure 27 : Caractérisation de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 détectée par immunohistochimie chez la souris M83 exposée par voie orale à un herbicide, le paraquat.

Des immunomarquages nucléaires sont localisés dans les 3 régions cérébrales examinées (A-L) et des marquages périnucléaires sont visibles dans le tronc cérébral (A; B ;G ;H). Aucun immun marquage intracytoplasmique et des prolongements neuronaux, tel qu'observé chez une souris M83 symptomatique, n'a été observé. Une coloration importante du neuropile est présente (A-L).

Les animaux exposés et non exposés au paraquat ne présentent pas de différences évidentes

Dans le tronc cérébral (A ; B ; G ; H), les immunomarquages sont importants dans les noyaux des cellules, sans marquage bien identifiable des prolongements neuronaux.

L'hippocampe (C ; D ; I ; J) est immunomarké en particulier au niveau de la zone CA2, montrant l'alpha-synucléine phosphorylée présente dans le noyau et le cytoplasme de la cellule de façon diffuse avec la présence d'un immunomarkage dans le prolongement neuronal.

Echelle : A-L sont à 20 μ m

A partir des images obtenues, nous avons quantifié les immunomarquages de l'alpha-synucléine phosphorylée à l'aide du logiciel Fiji, en utilisant un programme de quantification des immunomarquages. Les résultats ont été traités (illustrés et analysés) avec le logiciel Prism (Figure 28) pour 3 régions du système nerveux central : le tronc cérébral, le cortex cérébral et la zone CA2 de l'hippocampe.

A l'âge de 8 et 10 mois (6 et 8 mois d'exposition), il n'apparaît aucune différence entre les animaux exposés et non exposés au niveau du tronc cérébral et du cortex cérébral. Dans la zone CA2 de l'hippocampe, nous avons constaté une diminution d'environ 10% (animaux de 8 mois) ou 20% (animaux de 10 mois) de la quantité d'alpha-synucléine phosphorylée (Figure 28). Il est souligné que cette différence n'est pas statistiquement significative compte tenu du faible effectif de l'étude.

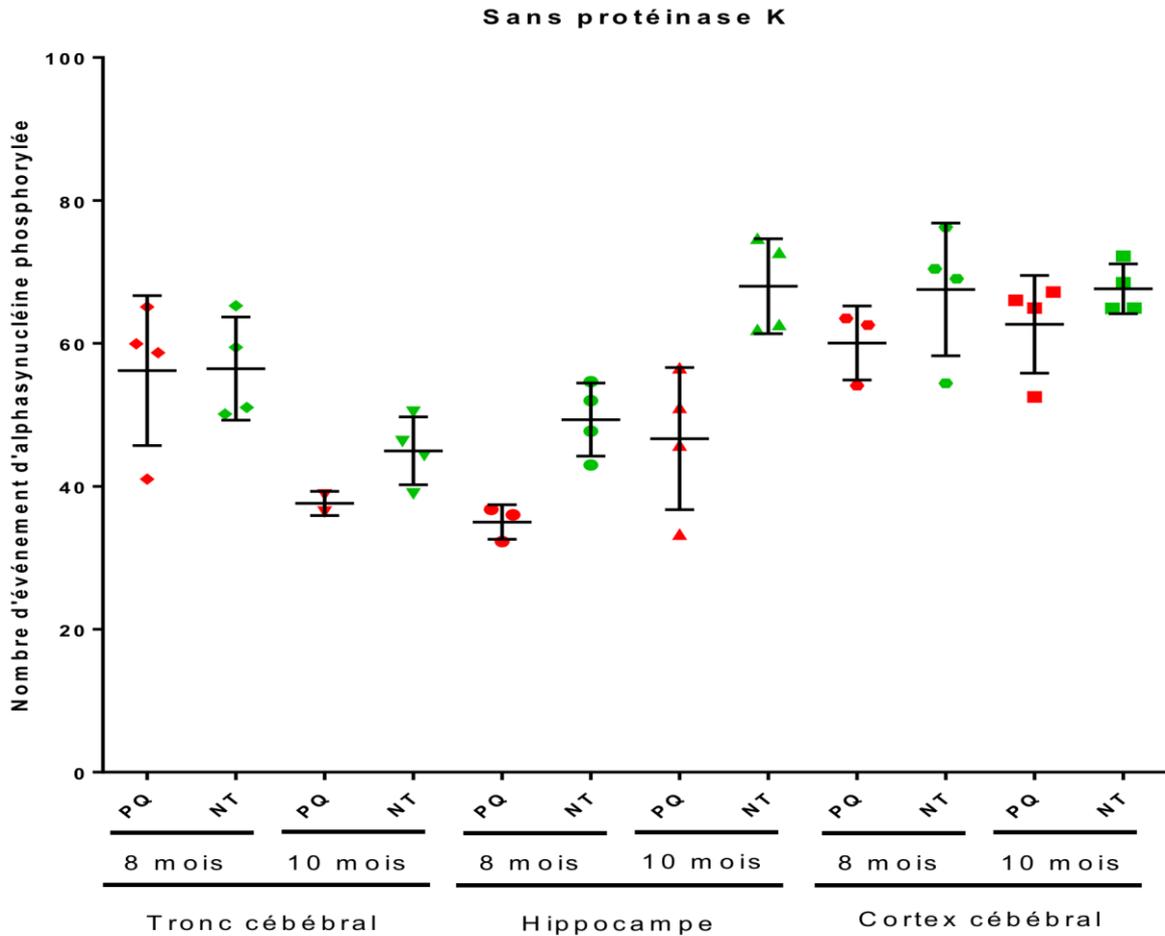


Figure 28 : Représentation graphique du nombre d'évènements correspondants aux immunomarquages d'alpha-synucléine phosphorylée dans trois régions cérébrales de souris M83 exposées ou non au paraquat.

Ce graphique décrit la quantité en nombre d'évènement de l'alpha-synucléine phosphorylée présent dans les trois régions d'intérêt grâce au logiciel Prism. Il n'existe aucune différence entre les animaux exposés (points rouges) ou non (points verts) au paraquat.

b. Résistance à la protéinase K des immunomarquages d'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129

Comme précédemment réalisé chez des souris M83 développant des signes cliniques de paralysie, nous avons étudié la résistance à la protéinase K des immunomarquages après exposition au paraquat.

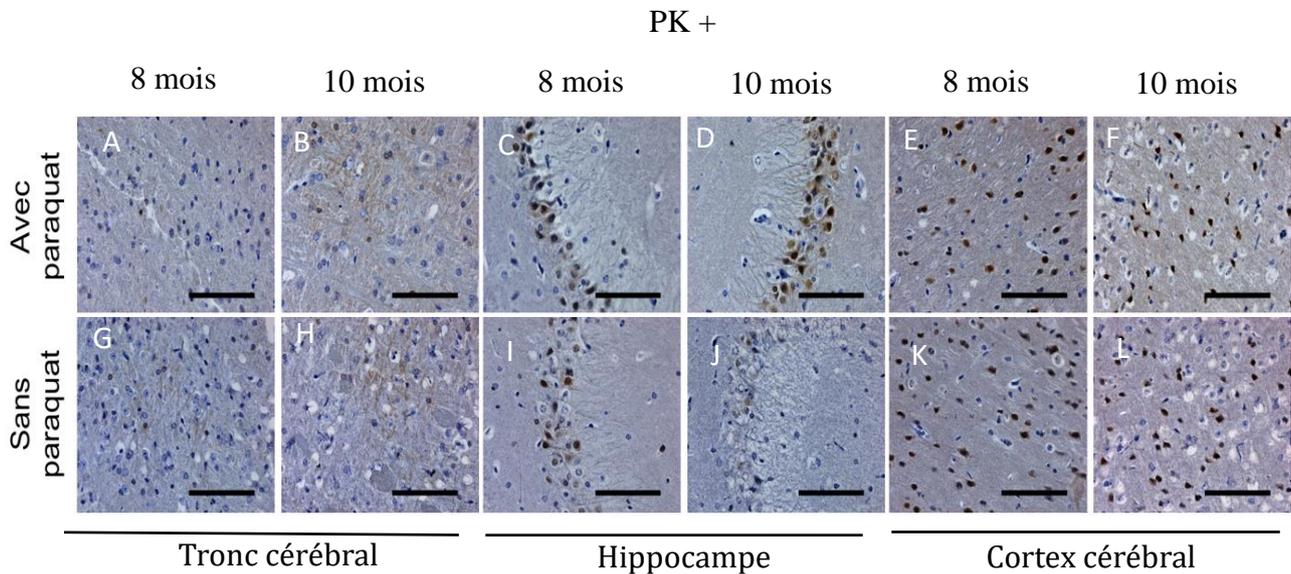


Figure 29 : Caractérisation de la résistance à la protéinase K de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 détectée par immunohistochimie chez la souris M83 exposée par voie orale à un herbicide, le paraquat

L'alpha-synucléine phosphorylée dans le tronc cérébral a été totalement digérée par la protéinase K, alors qu'au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe, on observe une résistance à la protéinase K des immunomarquages. Les immunomarquages nucléaires apparaissent nets et très intenses dans le cortex cérébral. Dans l'hippocampe, un immunomarquage nucléaire et des prolongements neuronaux persistent également après digestion par l'enzyme.

Chez les animaux exposés au paraquat, une quantité légèrement plus importante d'immunomarquages pourrait être présente.

Echelle : A-L sont à 20 μ m

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 29, pour les trois régions cérébrales et les deux durées d'exposition au paraquat en comparaison aux conditions contrôles. D'un point de vue qualitatif, pour l'ensemble des animaux (exposés ou non exposés), le marquage du neuropile a complètement disparu après digestion à la protéinase K. Seul un immunomarquage nucléaire est observé dans le cortex et l'hippocampe après digestion à la protéine K. On note également

pour la région CA2 de l'hippocampe, une résistance de l'immunomarquage au niveau des prolongements cytoplasmiques.

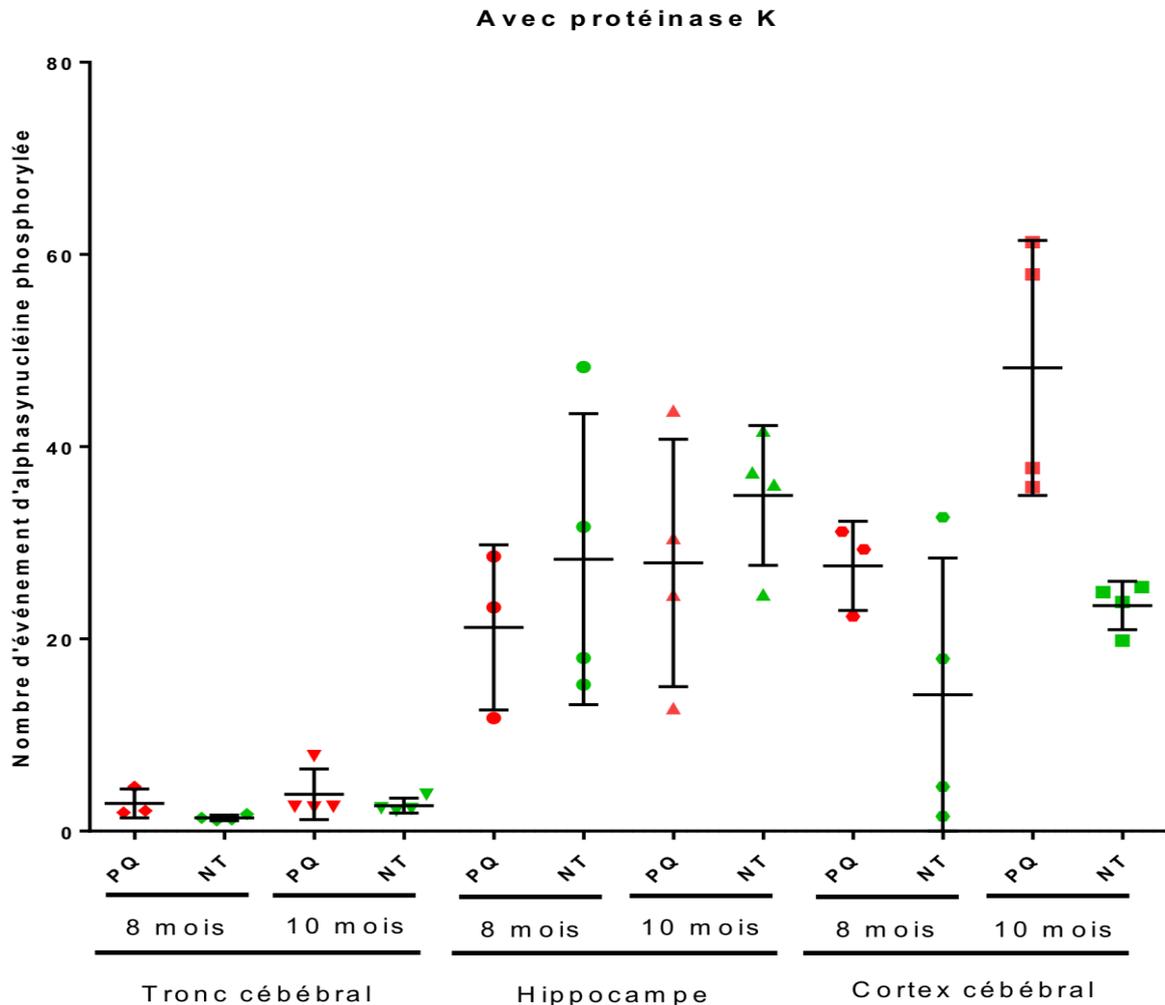


Figure 30 : Représentation graphique du nombre d'évènements correspondants aux immunomarquages d'alpha-synucléine phosphorylée dans trois régions cérébrales de souris M83 exposées (points rouge) ou non (points verts) au paraquat

Le nombre d'évènements correspondants aux immunomarquages résistants à la protéinase K a été reporté dans ce graphique. En effet, il existe une différence dans le cortex cérébral où les animaux traités par le paraquat présente plus d'agrégation que dans les autres régions cérébrales.

Au niveau du cortex cérébral on observe une différence très significative du nombre d'évènements, plus nombreux à partir des souris exposées au paraquat.

Pour évaluer un éventuel changement quantitatif, le pourcentage de pixels immunomarqués dans la région étudiée a également été déterminé à l'aide du logiciel Fiji.

Au niveau de l'hippocampe et du tronc cérébral, il n'y a pas de différences entre les animaux traités ou non. A l'inverse, dans le cortex cérébral, la quantité d'immunomarquage est en moyenne de 20 à 25-30 % plus élevée chez les animaux exposés pendant 6 ou 8 mois respectivement (Figure 30). Mais il est à souligner que cette différence n'est pas statistiquement significative compte tenu du faible effectif étudié.

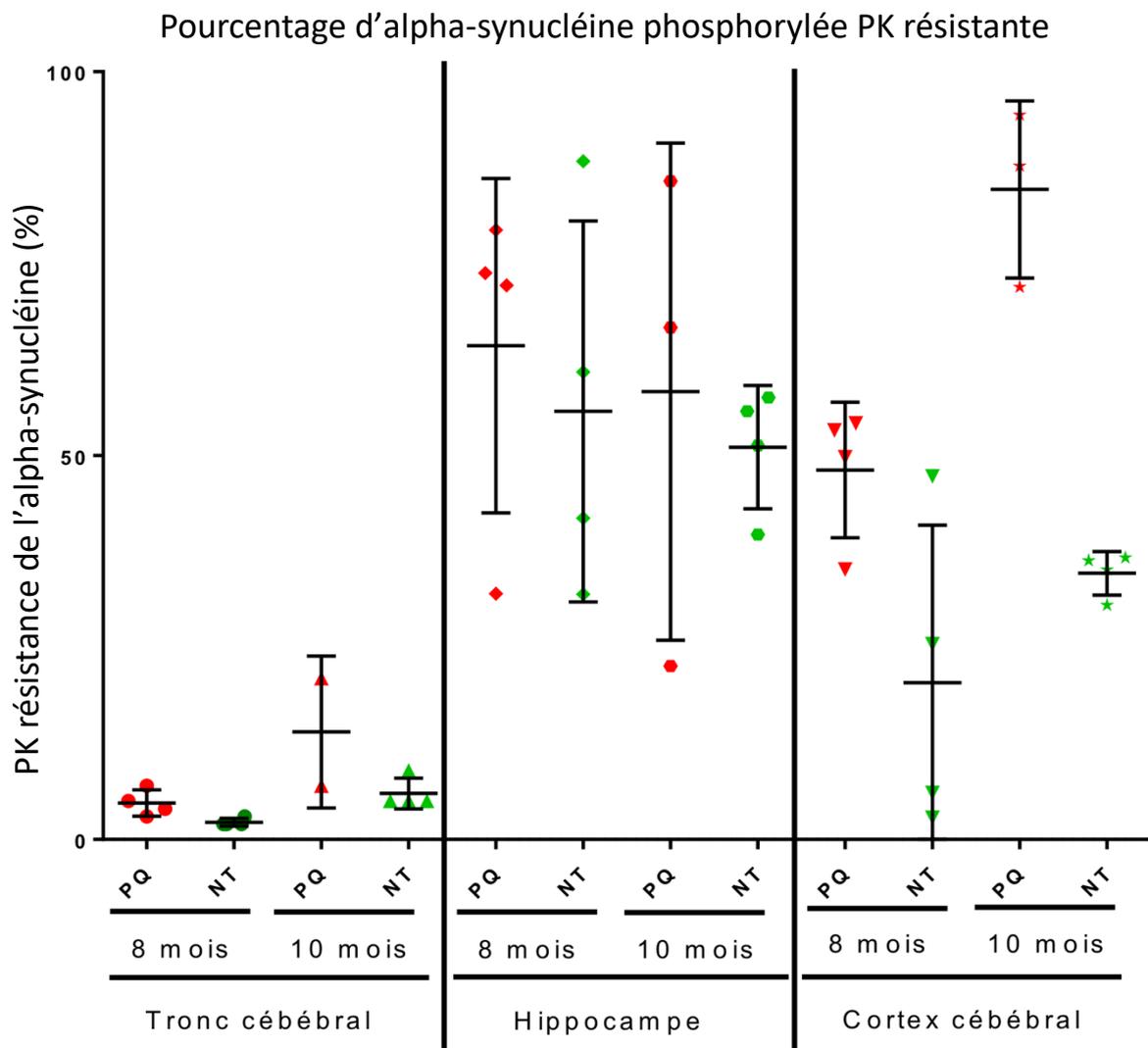


Figure 31 : Comparaison des ratios des évènements correspondants aux immunomarquages d'alpha-synucléine phosphorylée observés sur les coupes traitées/non traitées par la protéinase K.

Le ratio des valeurs trouvées représentées dans les figures 15 (avec protéinase K) et 13 (sans protéinase) montre une différence significative uniquement dans le cortex cérébral entre les animaux exposés ou non au paraquat.

Au niveau du tronc cérébral et de l'hippocampe, il n'existe pas de différence entre les animaux âgés de 8 et 10 mois, selon qu'ils aient été exposés (points rouges ou non (points verts) au paraquat.

Dans le cortex cérébral en revanche, ce ratio d'évènements d'alpha-synucléine phosphorylée avec/sans protéinase K est inférieur à 50% pour les animaux non exposés au paraquat, alors qu'il est généralement supérieur à 50% pour les coupes tissulaires provenant de souris exposées au paraquat. Cette différence est particulièrement marquée pour les coupes tissulaires provenant de souris âgées de 10 mois (exposées 8 mois au paraquat)

Sur la base des résultats qualitatifs obtenus, avant et après PK digestion, nous avons estimé le pourcentage d'alpha-synucléine phosphorylée qui était PK résistante pour l'ensemble des animaux de cette étude.

Si on observe les résultats obtenus,
$$\frac{(\% \text{ Pixels immunomarqués après PK})}{(\% \text{ Pixels immunomarqués avant PK})}$$
 on note quelques

soit les régions, un pourcentage d'alpha-synucléine phosphorylée PK résistant plus important.

Chez les souris exposées au paraquat par comparaison aux animaux contrôles, cette différence est plus marquée dans la région du cortex cérébral même si les différentes observations ne sont pas statistiquement significatives.

c. Recherche de modifications post-traductionnelles par nitration protéique

Pour compléter notre travail, nous avons recherché un éventuel processus de nitration protéique, notamment de l'alpha-synucléine, chez les souris M83 exposées au paraquat.

Comme illustré dans la figure 32, aucun immunomarquage n'est observé chez les souris exposées pendant 8 mois au paraquat avec l'anticorps Nsyn14 dirigé contre l'alphasynucléine nitrée en tyrosine 39. Il en est de même avec l'anticorps dirigé contre la 3-nitrotyrosine qui détecte la nitration protéique (Figure 32). Nous n'avons ainsi obtenu aucun élément en faveur d'une nitration de l'alpha-synucléine alors même que cette modification post-traductionnelle, peut être observée en présence d'un stress oxydatif induit par une exposition au paraquat.

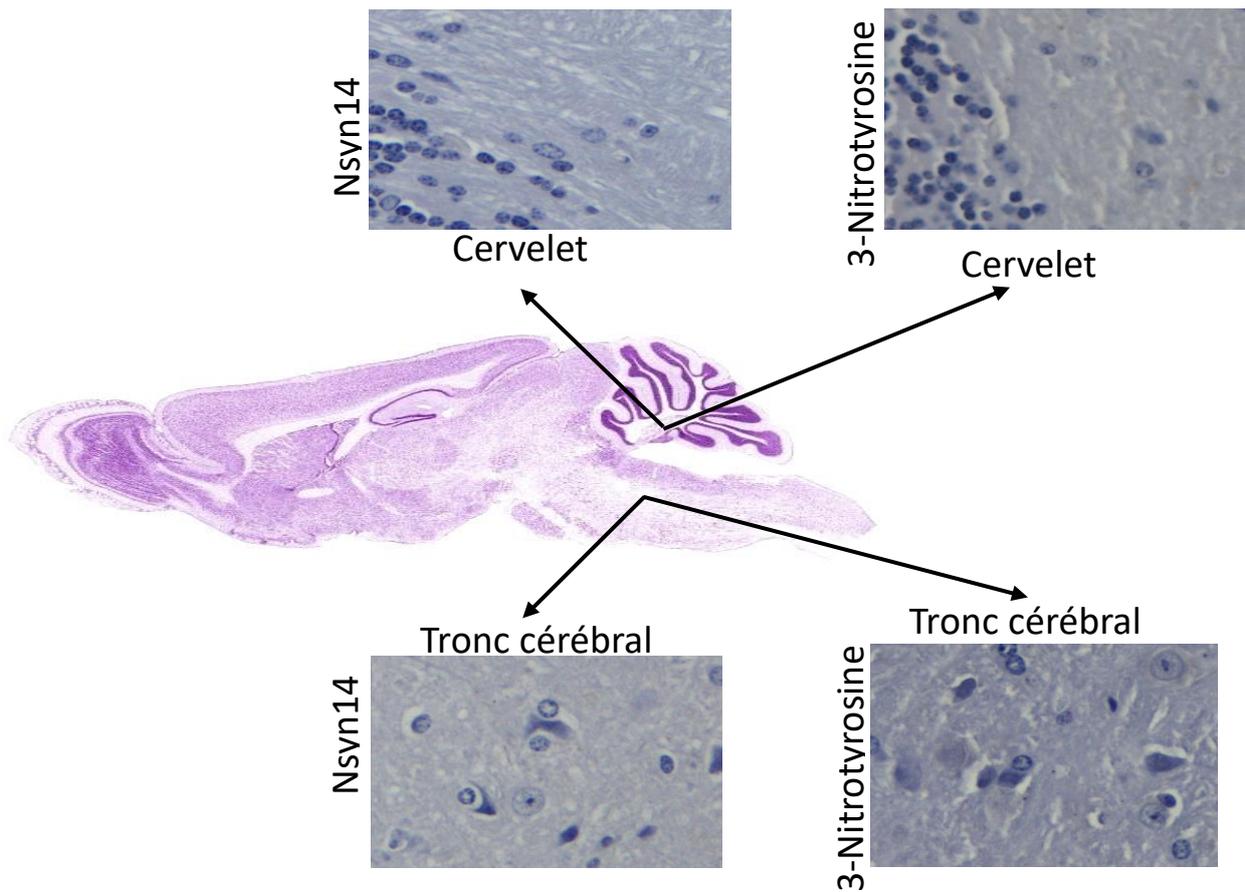


Figure 32 : Essai de détection de l'alpha-synucléine nitrée en tyrosine 39 par l'anticorps nSyn14 (Merck) et de la 3-Nitrotyrosine par immunohistochimie dans le tronc cérébral et le cervelet de la souris M83 exposé au paraquat par eau de boisson

Aucune immunoréactivité n'est observée, y compris après une exposition pendant 8 mois au paraquat par voie orale. Barre d'échelle = 50 μ m

V. Recherches de modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine humaine mutée A53T exprimée à l'aide par d'un vecteur viral adéno-associé

Pour compléter notre étude nous avons pu disposer d'un petit nombre d'échantillons issus d'expérimentations réalisées par le laboratoire sur un modèle d'expression de l'alpha-synucléine humaine mutée A53T. Un vecteur d'expressions sous contrôle du promoteur de la synapsine a été construit et une suspension virale a été produite et titrée, grâce à la collaboration

d'une équipe de l'INSERM (Dr A. Salvetti, CIRI, Lyon). Une expérimentation a été réalisée par injection intracérébroventriculaire de souris nouveaux nés le jour de la naissance (15), à raison de 2.5µL d'AAV par ventricule soit une quantité de $6,25 \cdot 10^8$ génome viral, chez des souris C57Bl/KO qui n'expriment pas l'alpha-synucléine murine. Les animaux (n=6) ont été sacrifiés à l'âge de 5 mois, trois d'entre eux étant issus d'un lot expérimental exposé au paraquat à partir de l'âge de 2 mois et comme précédemment décrit chez les souris M83.

Nous avons recherché la présence éventuelle d'alpha-synucléine sous forme phosphorylée en sérine 129. Nous avons observé des immunomarquages dont la localisation neuro-anatomique est illustrée par la figure 32.

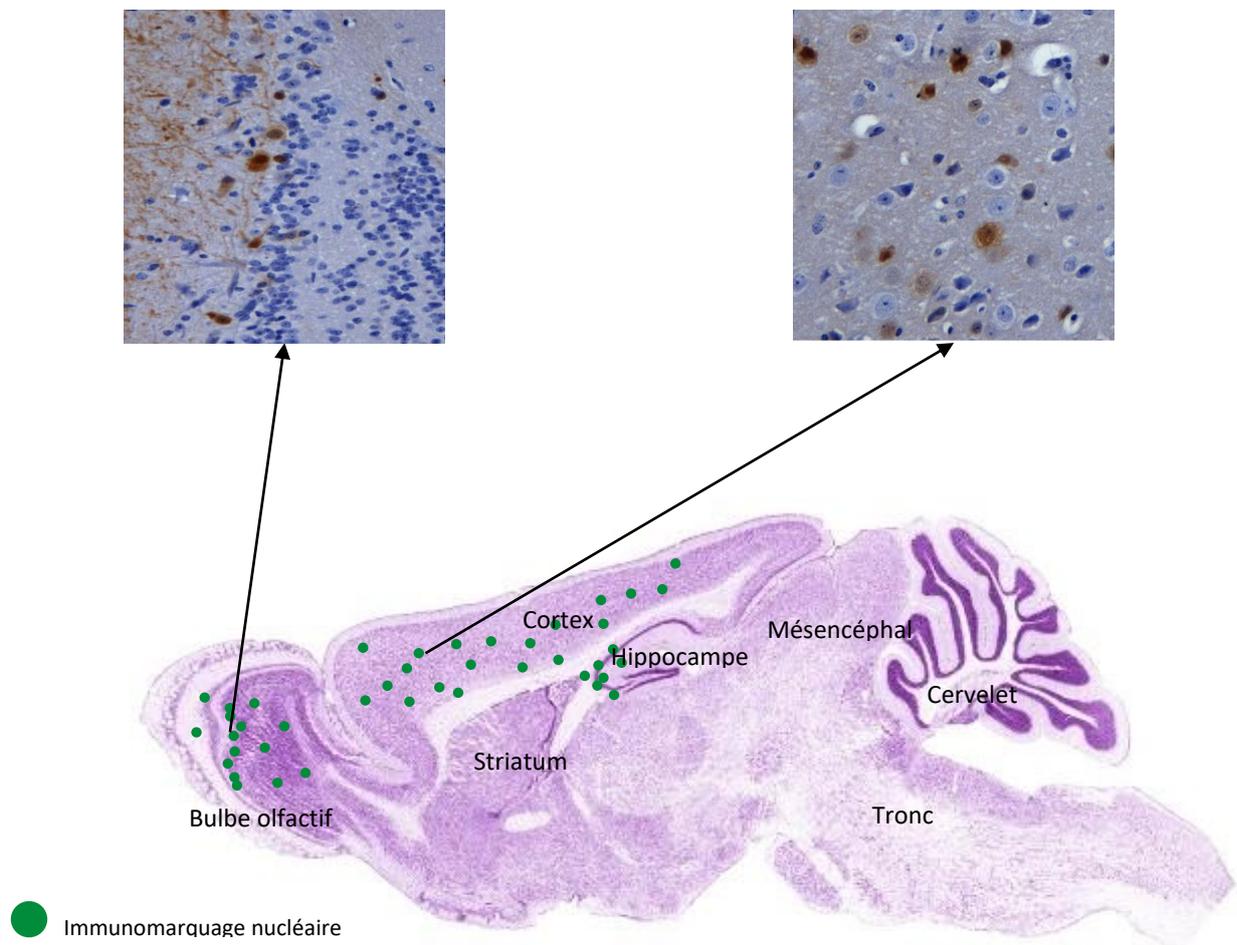


Figure 33: Représentation schématique de la distribution d'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 dans le cerveau d'une souris C57Bl/6 (KO alpha-synucléine murine) inoculée par voie intra-cérébro-ventriculaire à la naissance par un virus adéno-associé (AAV) permettant l'expression de l'alpha-synucléine humaine A53T.

L'inoculation d'AAV alpha-synucléine A53T par voie ICV montre une présence de la protéine sous forme phosphorylée en sérine 129 principalement dans les zones antérieures du cerveau, en particulier le cortex cérébral, le bulbe olfactif et l'hippocampe. Le bulbe olfactif présente dans sa couche plexiforme interne des noyaux immunomarqués ainsi que des marquages des prolongements neuronaux particulièrement bien identifiables dans cette région cérébrale. Des immunomarquages sont aussi observés au niveau nucléaire dans le cortex cérébral.

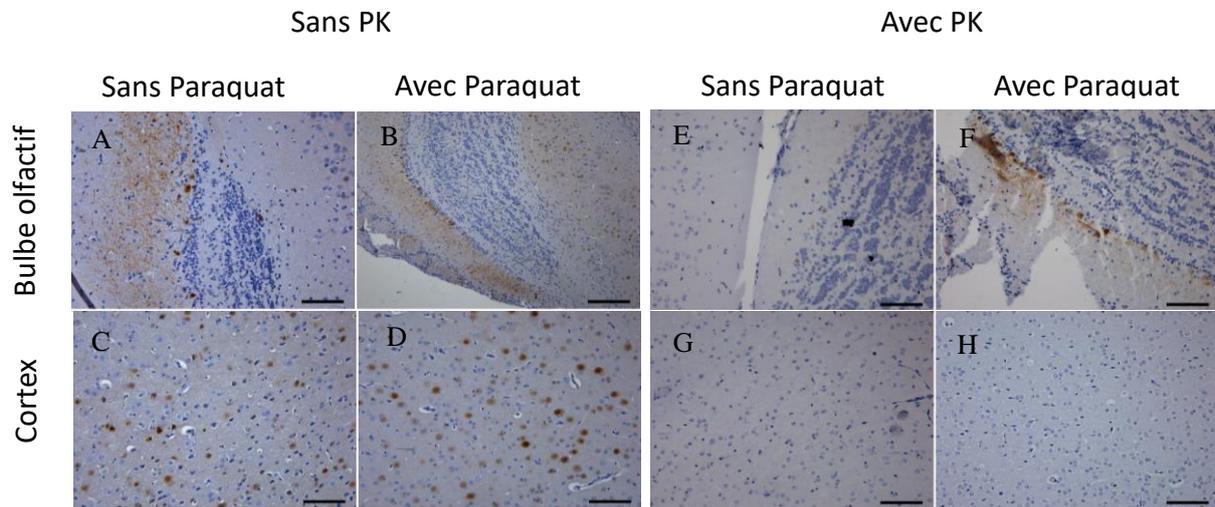


Figure 34 : Distribution de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 (Ab51253) chez la souris C57Bl6 KO inoculé en intra-cérébroventriculaire par des AAV alpha-synucléine A53T. Taille d'échelle : A -H = 20 μ m

A-H : des immunomarquages d'alpha-synucléine phosphorylée sont observées dans le bulbe olfactif et le cortex, aucune différence n'est présente avec ou sans paraquat

I-P : Il existe une sensibilité importante à la protéinase K sauf dans le bulbe olfactif (J ; L) en présence de paraquat.

Des immunomarquages sont observés dans le bulbe olfactif et le cortex cérébral ; l'ensemble des autres régions ne présente aucun immunomarquage. Dans le cortex cérébral, des immunomarquages uniquement nucléaires sont observés. Concernant le bulbe olfactif, nous observons des marquages nucléaires et des immunomarquages des prolongements neuronaux.

Bien que très préliminaires et obtenus à partir d'un nombre d'animaux extrêmement limité, nos résultats montrent globalement que cette stratégie permet d'exprimer efficacement et de façon durable l'alpha-synucléine, qui est détectée sous une forme phosphorylée en sérine 129 dans les régions antérieures du cerveau.

Chez les animaux exposés au paraquat, le profil de détection de l'alpha-synucléine phosphorylée est inchangé. La protéine est présente également dans le bulbe olfactif et le cortex sans modification (qualitatives, quantitatives) évidentes (Figure 33).

Nous avons évalué la PK résistance de cette alpha-synucléine phosphorylée chez les animaux exposés ou non exposés au paraquat. Pour l'ensemble des souris, dans nos conditions expérimentales, on observe une disparition de l'alpha-synucléine phosphorylée dans le cortex et le maintien d'un faible immunomarquage dans le bulbe olfactif.

Discussion :

Les données de notre travail apportent de nouvelles informations sur le développement de la pathologie de l'alpha-synucléine, au niveau cérébral, dans le modèle de souris transgéniques M83. Nos travaux ont porté sur les modifications post-traductionnelles qui accompagnent ce développement de la pathologie. Obtenues par des analyses immunohistochimiques, ces données confortent un nouvel axe de travail pour la caractérisation de ces pathologies, complémentaire aux études en biochimie déjà largement implantées au laboratoire.

La méthode mise en place en immunohistochimie a permis de mettre en évidence différents aspects de la protéine selon l'âge de l'animal, l'exposition éventuelle à un pesticide, le paraquat, et chez les animaux M83 présentant une paralysie qui survient chez les animaux âgés. Dans cette étude, trois régions cérébrales ont surtout été étudiées, le tronc cérébral, l'une des régions du système nerveux central dans lesquelles les lésions sont les plus importantes lors de la maladie des souris M83 (28), mais aussi, le cortex cérébral et l'hippocampe, cette dernière région étant souvent trouvée entièrement indemne de lésions au stade de la paralysie. Nous avons d'abord recherché la détection de l'alpha-synucléine sous sa forme phosphorylée en sérine 129, une modification post-traductionnelle considérée comme majeure lors des synucléinopathies.

I - Evolution des caractéristiques immunohistochimiques de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez les souris M83

1. Localisation neuro-anatomique et sub-cellulaire de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 au cours du vieillissement
 - a. Immunomarquages de localisation nucléaire ou périnucléaire

Chez les souris M83 jeunes de moins de 6 mois, nous avons observé des immunomarquages nucléaires dans les trois régions du cerveau étudiées, dont l'existence a rarement été reconnue (6). Seulement dans l'hippocampe, ces marquages nucléaires sont accompagnés d'un marquage

diffus des cytoplasmes et prolongements neuronaux, ceci de façon particulièrement évidente dans la couche pyramidale de l'hippocampe.

On retrouve par ailleurs des immunomarquages périnucléaires dans les régions postérieures du cerveau, en particulier, le tronc cérébral, le mésencéphale et le thalamus, avant l'apparition des symptômes chez la souris M83.

Chez des souris M83 malades, des immunomarquages nucléaires sont majoritairement présents dans les parties antérieures comme le cortex cérébral et l'hippocampe, de la même façon que chez les souris jeunes.

Dans notre laboratoire, une étude a été réalisée précédemment par Naudet, 2017 chez les souris M83 exposées ou non au paraquat, dont notre travail représente la poursuite. Seuls des animaux jeunes de 3.5-4 mois ont été étudiés dans ce travail, exposés pendant 6 à 8 semaines au paraquat (51). Concernant les groupes contrôles non exposés au paraquat, l'alpha-synucléine phosphorylée n'est pas identifiée dans le cerveau dans cette étude.

Une autre publication (6) explique avoir trouvé dès l'âge de 3.5 mois des immunomarquages nucléaires avec le même anticorps (Ab51253) dans le cerveau. Avant cet âge, aucun immunomarquage n'a été observé chez les souris M83. L'auteur explique que l'alpha-synucléine est déjà observée précocement sous forme de marquages nucléaires, ce qui n'est pas évoqué dans la publication ultérieure de Naudet, 2017.

Une équipe a travaillé sur un autre modèle de souris transgénique exprimant l'alpha-synucléine humaine avec une mutation différente, A30P. (67) De façon très intéressante, des immunomarquages nucléaires ont aussi été observés dans le cerveau, en particulier dans les régions corticale et hippocampique. Une augmentation des immunomarquages nucléaires est observée chez les souris âgées, qui sont plus localisées dans les parties corticales du cerveau chez les animaux jeunes. Dans notre modèle M83, les immunomarquages sont bien identifiables chez les animaux jeunes.

b. Immunomarquages intra-cytoplasmiques et des neurites

Une souris M83 malade est un animal qui présente une paralysie du train arrière, une posture voûtée et un amaigrissement. Lorsque la souris est malade, on observe un immunomarquage intense au niveau du cytoplasme et des neurites, caractéristique de la maladie de la souris M83, ceci dans les parties postérieures du cerveau comme le tronc cérébral, le mésencéphale ou le thalamus. Dans le cortex cérébral ces immunomarquages intra-cytoplasmiques et des neurites sont beaucoup plus épars et ils sont remarquablement absents de l'hippocampe.

2. Localisation neuro-anatomique et sub-cellulaire de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 inoculée par des extraits cérébraux de souris M83

Les souris M83 inoculées par voie intra-cérébroventriculaire (ICV) et intra-péritonéale (IP) avec du cerveau de souris M83 malade (66) ou un produit d'amplification in vitro obtenu par des cycles de sonication-incubation d'un cerveau de souris M83 jeune (53) montrent une pathologie accélérée. Dans ces différentes expérimentations, les souris M83 homozygotes ont développé une paralysie avant l'âge de 8 mois (âge minimal d'apparition de la maladie lors du vieillissement normal) et montrent par immunohistochimie des inclusions intra-cytoplasmiques accompagnées de marquages des neurites, particulièrement dans la partie postérieure du cerveau.

Pour les inoculations de cerveau malade de souris M83 par ICV et IP, deux génotypes ont été utilisés, homozygote et hémizygote pour l'alpha-synucléine (66). Les souris homozygotes développent la maladie plus rapidement que les souris hémizygotes, en relation avec le niveau d'expression réduit du transgène chez ces dernières. Les immunomarquages sont très abondants dans la partie postérieure du cerveau en particulier dans le tronc cérébral, le mésencéphale et le

thalamus, résultats concordants avec les observations de Sargent et al., 2017 reposant sur la détection par Western blot et test ELISA de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129.

Ces travaux peuvent être comparés à ceux réalisés par injections de fibres d'alpha-synucléine agrégée d'origine recombinante à des souris M83 hémizygotés, par différentes voies d'inoculation et en particulier intra-cérébrale et intra-péritonéale (42). Cette étude montre, concernant cette comparaison des deux voies d'inoculations, une atteinte hippocampique avec la seule voie d'inoculation intracérébrale, sous forme de marquages cytoplasmiques et neuritiques avec un anticorps dirigé contre l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129. Nous n'observons pas de tels immunomarquages hippocampiques, également rapportés par Lau et al., 2019 après inoculation intra-cérébrale d'extraits de cerveau de souris M83 malade. Dans notre étude, il existe une différence sur le développement de la maladie selon le mode d'inoculation et le génotype des animaux. Le génotype montre une différence sur la quantité de protéine présente dans les parties postérieures du cerveau, les animaux homozygotes présentent plus d'alpha-synucléine phosphorylée que les souris hémizygotés. Dans les parties antérieures, à un jeune âge, les différents facteurs n'entraînent pas de différence contrairement aux régions postérieures.

3. Localisation neuro-anatomique et sub-cellulaire de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris M83 exposée au paraquat

S'agissant de la recherche de l'impact de l'exposition au paraquat, notre étude est ainsi en continuité avec le travail publié par Naudet et al., 2017 chez des souris M83 après exposition par voie orale au paraquat. Les animaux étudiés ont été, exposés par voie orale au paraquat à partir de l'âge de deux mois, pour savoir notamment si le paraquat avait un effet sur l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 et dans quelle mesure il pourrait éventuellement induire

plus précocement la pathologie de la souris M83. Chez les souris M83 exposées par voie orale au paraquat pendant 6 ou 8 mois, on n'observe aucune altération de l'état général des animaux et aucune symptomatologie particulière. Une hypothèse pouvait être l'apparition précoce d'alpha-synucléine sous la forme d'inclusions cytoplasmiques et des prolongements neuronaux dans les parties postérieures du cerveau. Nos résultats ne montrent pas, y compris jusqu'à l'âge de 10 mois (6 mois d'exposition) pas de telles lésions neuronales, comme elles sont observées chez des souris M83 développant une paralysie. Nous avons observé des immunomarquages, essentiellement nucléaires, dans le cortex cérébral ou l'hippocampe, sur lesquels nous n'avons cependant pas observé d'effet significatif de l'exposition au paraquat.

Une autre étude publiée a été réalisée chez la souris M83, utilisant une autre voie d'exposition au paraquat, la voie intra-péritonéale (54). Dans cette étude, seule l'injection combinée de paraquat et d'un fongicide, le manèbe, a permis d'observer des effets significatifs (54). Cette étude décrit ainsi chez les souris co-exposées au paraquat et au manèbe, avec l'anticorps conformationnel Syn303 utilisé en immunohistochimie, des inclusions de taille variable dans la couche granulaire du cortex cérébelleux, la couche moléculaire de l'hippocampe et les couches profondes des cortex somato-sensoriel et auditif, des régions cérébrales dans lesquelles la pathologie est absente chez les souris M83 malades. Il existe aussi une co-localisation des neurofilaments et de l'alpha-synucléine dans ces inclusions, sauf dans le cas des marquages hippocampiques. De façon très importante, ces lésions sont observées uniquement lors de co-exposition au paraquat et au manèbe chez les animaux âgés de 8 à 12 mois, qui restent asymptomatiques ; elles ne sont pas observées chez des souris M83 exposées à l'âge de 3 mois ou exposées, y compris à 8 ou 12 mois, au paraquat ou au manèbe seul.

II - Caractérisation de la résistance à la protéinase K de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 détectée par immunohistochimie chez la souris M83

La protéinase K est une enzyme de digestion des protéines permettant d'identifier une résistance de certaines protéines à son action protéolytique, qui témoigne dans ce cas de l'agrégation de cette protéine. Chez les souris M83 jeunes, aucune résistance n'est observée : toute l'alpha-synucléine phosphorylée est digérée. En revanche, lorsque la souris M83 vieillit, on observe une résistance accrue à la protéinase K, dans le cortex frontal et l'hippocampe.

Lorsqu'une souris M83 est malade suite à son vieillissement ou à des inoculations d'alpha-synucléine agrégée, les inclusions intra-cytoplasmiques et les marquages neuritiques, observés surtout dans les régions postérieures du cerveau, sont résistants à la protéinase K. Les immunomarquages nucléaires ou/et intra-cytoplasmiques observés dans le cortex cérébral et dans l'hippocampe le sont également.

Concernant les souris M83 exposées au paraquat pendant 6 ou 8 mois par voie orale, lorsque, nous avons observé une résistance à la protéinase K des immunomarquages au niveau du cortex cérébral, significativement plus importante chez les animaux exposés au paraquat, par comparaison aux animaux non exposés. (21) Un autre modèle de souris transgénique exprimant l'alpha-synucléine humaine de séquence normale sous contrôle du Thy-1 a montré une résistance accrue de l'alpha-synucléine à la protéinase K, dans la substance noire, après injections intra-péritonéales répétées de paraquat, suggérant un possible effet du paraquat sur l'agrégation de la protéine. Concernant nos propres travaux, d'autres approches mériteraient cependant de conforter nos résultats préliminaires comme la recherche d'un co-marquage par l'ubiquitine/p62 ou la fluorescence avec la thioflavine S, deux marqueurs souvent utilisés associés à l'agrégation de l'alpha-synucléine.

III - Essais de détection de protéines nitrées chez la souris M83

1. A l'aide d'anticorps dirigés contre la 3 nitro-tyrosine

L'identification de la 3 nitro-tyrosine à l'aide d'un anticorps spécifique permet de détecter les protéines ayant subi une modification post-traductionnelle par un processus de nitration. Un stress oxydatif peut être à l'origine de la nitration de la protéine. (27)

Le marquage est présent dans le cytoplasme de la cellule et des prolongements neuronaux.

L'étude préalablement décrite de Norris, 2007 après injections intra-péritonéales répétées de paraquat et de manèbe à des souris M83 a comporté une recherche de protéines nitrées à l'aide de l'anticorps N808. Ils ont observé un immunomarquage dans le cervelet et le mésencéphale avec cet anticorps N808 chez les animaux co-exposés au paraquat et au manèbe.

Nous avons également pour notre part recherché un tel phénomène de nitration à l'aide d'un anticorps dirigé contre la 3 nitro-tyrosine, dans le but de savoir si nous pouvions identifier une protéine sous forme nitrée dans le cerveau des souris M83, notamment celles ayant été exposées de façon chronique au paraquat ou chez des animaux âgés ou malades. Nous n'avons cependant observé aucun immunomarquage avec un tel anticorps, y compris après amplification du signal par le kit ABC ou/et l'Impact DAB. De façon importante nous ne disposions pas pour nos expériences d'un contrôle positif permettant de valider la technique que nous avons utilisée et cherchée à développer par différentes variantes de notre protocole.

2. A l'aide d'anticorps spécifique de l'alpha-synucléine nitrée

L'étude de Norris et al., 2017 chez les souris M83 co-exposées par voie intra-péritonéale au paraquat et au manèbe a utilisé l'anticorps nSyn 14 spécifique de la protéine alpha-synucléine nitrée en tyrosine 39 (27). Un immunomarquage d'inclusion est montré dans le cervelet et le mésencéphale. (54)

Des éléments en faveur d'une nitration de l'alpha-synucléine n'ont pas pu être obtenus dans notre étude chez les souris M83, y compris après exposition pendant 8 mois au paraquat, malgré nos essais d'amplification du signal. Comme précédemment indiqué, nous ne disposons cependant pas d'un témoin positif qui aurait pu nous permettre de vérifier la validité du protocole que nous avons cherché à développer.

Il est cependant important de souligner que les protocoles d'exposition des souris utilisés dans l'étude de Norris, 2017 et dans notre étude sont très différents, avec une exposition chronique par voie orale à partir de l'âge de 2 mois et jusqu'à l'âge de 8 ou 10 mois au paraquat seul dans notre cas et une exposition de souris de 8 ou 12 mois par des injections intra-péritonéales répétées et combinées au paraquat et au manèbe dans l'étude de Norris et al. (54).

IV - Caractéristiques immunohistochimiques de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129 chez la souris C57Bl6 (KO alpha-synucléine murine) inoculée par un virus adéno-associé (AAV) permettant l'expression de l'alpha-synucléine humaine A53T

Pour compléter notre travail nous avons cherché à évaluer dans un travail très préliminaire les modifications post-traductionnelles de l'alpha-synucléine dans un modèle tout à fait distinct d'expression de l'alpha-synucléine humaine mutée A53T, obtenue par injection intra-cérébroventriculaire d'un virus adéno-associé chez le souriceau nouveau-né. Cette stratégie d'inoculation a déjà été décrite pour l'alpha-synucléine humaine de séquence normale par Delenclos et al.. Il s'agit d'une stratégie originale par comparaison à la plupart des études reposant sur l'inoculation stéréotaxique dans le système nigro-strié chez le rongeur adulte, qui visent à tenter de modéliser la maladie de Parkinson. (15)

Les souris C57Bl/6 (KO pour l'alpha-synucléine murine) inoculées avec un AAV alpha-synucléine humaine A53T que nous avons pu étudier montrent des immunomarquages,

notamment nucléaires, à l'avant du cerveau, au niveau du bulbe olfactif, du cortex cérébral et de l'hippocampe. Nous avons utilisé l'anticorps Ab51253 pour la détection de l'alpha-synucléine sous sa forme phosphorylée en sérine 129 alors que Delenclos (15) a utilisé, notamment, l'anticorps psyn 64 après injection intra-cérébroventriculaire chez la souris nouveau-née d'un virus adéno-associé permettant l'expression de l'alpha-synucléine humaine de séquence normale. De façon intéressante, nous avons de la même façon détectée des immunomarquages dans les mêmes régions cérébrales antérieures, et des marquages de localisation parfois nucléaire. Delenclos (15) a détecté des immunomarquages cytoplasmiques avec des prolongements dans le bulbe olfactif, il a avant tout utilisé un anticorps alpha-synucléine total avant de rechercher la phosphorylation. Nous n'avons pas utilisé d'anticorps totaux car nous avons des animaux knockout alpha-synucléine mais il serait intéressant de vérifier et comparer nos immunomarquages avec cet anticorps.

Il est à noter que si notre étude a inclus 3 souris exposées au paraquat, ce nombre d'animaux est beaucoup trop limité pour pouvoir rechercher un impact éventuel de l'exposition à ce pesticide sur l'alpha-synucléine détectée chez ces souris.

Il existe une sensibilité aux protéases dans cette étude sur les AAV alpha-synucléine A53T (15), nous observons une sensibilité identique sauf dans le bulbe olfactif où une résistance à la protéinase K est observée sur les immunomarquages présentant un prolongement.

Par ailleurs, nous avons ici focalisé notre étude sur la recherche de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129, comme décrit pour la recherche d'indicateurs de la pathologie protéique dans le modèle transgénique M83. Notre étude confirme tout à fait clairement l'identification de cette modification post-traductionnelle, comme décrit par Delenclos et al. (15)

Il est aussi intéressant de noter l'originalité de la stratégie que nous avons choisie au laboratoire, par inoculation de souris n'exprimant pas l'alpha-synucléine murine, et qui nous offre la

possibilité de détecter spécifiquement la protéine humaine exprimée par le virus adéno-associé à l'aide de n'importe anticorps disponible à l'exception des très rares anticorps spécifiques de la protéine murine. En effet la grande majorité des anticorps disponibles, y compris les anticorps dirigés contre l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129, ne reconnaissent pas spécifiquement la protéine humaine, de telle sorte que le signal observé peut refléter à la fois l'expression ou/et les modifications post-traductionnelles des alpha-synucléines humaines et murine, qui sont en effet co-exprimées dans un modèle transgénique comme la lignée M83.

Conclusion

Le développement de la pathologie de l'alpha-synucléine s'accompagne de modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la nitration et la résistance aux protéases. La protéine sous sa forme pathologique peut ainsi être détectée grâce à un anticorps dirigé contre la protéine phosphorylée en sérine 129 (p.ex. Ab51253) sous la forme d'immunomarquages cytoplasmiques et des prolongements neuronaux. Différents stades de marquages ont été observés dans les neurones du modèle transgénique M83 que nous avons étudié, avec des stades « précoces » précédant la pathologie caractéristique observée chez les souris développant des signes cliniques. A ces stades « précoces » des immunomarquages nucléaires et périnucléaires sont observés. Des immunomarquages cytoplasmiques et des neurites de Lewy sont ensuite présents en grande quantité dans le cerveau, en particulier dans la partie postérieure regroupant le tronc cérébral, le mésencéphale et le thalamus lorsque les souris présentent des signes cliniques de paralysie. Une autre modification post-traductionnelle est observée à ces stades, la résistance aux protéases de l'alpha-synucléine phosphorylée en sérine 129. Cependant, cette résistance a été observée pour les marquages nucléaires visibles surtout dans le cortex cérébral et l'hippocampe chez les animaux jeunes, non malades, ainsi que pour les immunomarquages cytoplasmiques et des prolongements neuronaux lorsque les animaux sont malades.

La nitration des protéines est due à un phénomène appelé stress oxydatif. Chez les souris M83 que nous avons étudiées, nous n'avons pu observer aucune immunoréactivité avec un anticorps dirigé contre l'alpha-synucléine nitrée ou plus largement contre la 3-nitrotyrosine qui est présente dans les protéines nitrées. Nos résultats ne nous permettent pas d'identifier de phénomène de nitration, mais restent à prendre avec précaution en l'absence de contrôle positif disponible lors du développement de notre méthode de détection par immunohistochimie.

L'exposition chronique par voie orale pendant 6 ou 8 mois à un pesticide, le paraquat, n'a pas montré d'effet sur un éventuel déclenchement précoce de la paralysie, ni de symptômes particuliers chez les souris exposées. Toutefois, nous avons pu observer une résistance plus importante de l'alpha-synucléine phosphorylée à la protéinase K, dans le cortex cérébral seulement.

Les caractéristiques de l'alpha-synucléine, et ses modifications post-traductionnelles, peuvent être modulées dans le modèle M83 par inoculation de différents types d'agrégats d'alpha-synucléine (43) (49) (53) voire par l'exposition à des pesticides (54). L'évolution dans le temps de ces caractéristiques peut amener des informations sur les mécanismes de transformation de la protéine normale en protéine pathologique. Concernant les inoculations d'agrégats d'alpha-synucléine, la voie d'inoculation (intra-cérébrale ou périphérique), le génotype de l'animal (homozygote *versus* hémizygote) et le type d'agrégats utilisés (extraits cérébraux issus de différentes synucléinopathies, fibres d'origine recombinante, agrégats d'origine cérébrale produits par amplification *in vitro*) peuvent affecter de façon différente les caractéristiques lésionnelles. Ces caractéristiques pathologiques au stade terminal restent cependant dans l'ensemble très uniformes dans ce modèle expérimental, bien que des différences claires aient parfois été décrites (39).

Nous avons pu aborder la caractérisation de l'alpha-synucléine humaine, de même séquence mutée A53T, dans un tout autre modèle d'expression à l'aide d'un virus adéno-associé sous contrôle du promoteur synapsine injecté chez le souriceau nouveau-né par voie intra-cérébroventriculaire. Nous avons retrouvé des immunomarquages principalement nucléaires dans les régions postérieures du cortex cérébral, l'hippocampe ou le bulbe olfactif, sensibles à la digestion par la protéinase K.

Ce travail a permis de mettre en place une étude à l'aide de la technique d'immunohistochimie pour décrire l'évolution des caractéristiques de l'alpha-synucléine humaine A53T dans deux modèles d'expression de la protéine.

En perspective, il serait utile d'étudier des tissus cérébraux chez la souris M83 de la naissance à trois mois pour savoir si la protéine alpha-synucléine phosphorylée est présente à des âges plus précoces. Une autre étude pourrait permettre de mieux comprendre les modifications de la protéine au niveau cellulaire chez des animaux sacrifiés avant le déclenchement de la maladie. L'utilisation d'autres marqueurs de l'agrégation comme l'ubiquitine ou la thioflavine informerait plus précisément sur la nature de la protéine s'agissant des marquages nucléaires, observés notamment chez la souris M83 jeune dans des régions cérébrales peu (cortex cérébral) ou pas (hippocampe) concernés par la pathologie au stade terminal. En ce qui concerne la nitration protéique, la recherche d'un témoin positif, possiblement obtenu par exemple par l'exposition conjointe par voie intra-péritonéale au paraquat et au manèbe (54), avec la poursuite de développement de la méthode, nous indiqueraient si la nitration, que nous n'avons pas pu détecter dans notre étude, est présente ou non dans notre modèle d'exposition chronique par voie orale au paraquat seul.

Bibliographie

1. Anderson, John P., Donald E. Walker, Jason M. Goldstein, Rian de Laat, Kelly Banducci, Russell J. Caccavello, Robin Barbour, et al. « Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of Alpha-Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease ». *The Journal of Biological Chemistry* 281, n° 40 (6 octobre 2006) : 29739-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600933200>.
2. Ariesandi, Winny, Chi-Fon Chang, Tseng-Erh Chen, et Yun-Ru Chen. « Temperature-Dependent Structural Changes of Parkinson's Alpha-Synuclein Reveal the Role of Pre-Existing Oligomers in Alpha-Synuclein Fibrillization ». *PloS One* 8, n° 1 (2013): e53487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053487>.
3. Santé sur le net. « Atrophie multi systématisée : définition et symptômes ». Consulté le 24 août 2020. <https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/maladies-rares/atrophie-multi-systematisee/>.
4. Barbeau, A., M. Roy, T. Cloutier, L. Plasse, et S. Paris. « Environmental and Genetic Factors in the Etiology of Parkinson's Disease ». *Advances in Neurology* 45 (1987): 299-306.
5. Behari, Madhuri, Kalyan Brata Bhattacharyya, Rupam Borgohain, Shyamal Kumar Das, Bhaskar Ghosh, Asha Kishore, Syam Krishnan, et al. « Parkinson's disease ». *Annals of Indian Academy of Neurology* 14, n° Suppl1 (juillet 2011): S2-6. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.83083>.
6. Bensick. « Early and Persistent Expression of Phosphorylated α -Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α -Synuclein Transgenic Mice | Journal of Neuropathology & Experimental Neurology | Oxford Academic ». Consulté le 15 septembre 2020. <https://academic.oup.com/jnen/article/73/12/1144/2917688>.
7. Birman, S. « L' α -synucléine et la maladie de Parkinson : le grand méchant petit chaperon. » *médecine/sciences* 16, n° 8-9 (2000): 956. <https://doi.org/10.4267/10608/1764>.
8. Blocq, P., et G. Marinesco. « Sur Un Cas de Tremblement Parkinsonien Hémiplégique Symptomatique d'une Tumeur Du Pédoncule Cérébral ». </paper/Sur-un-cas-de-tremblement-parkinsonien-h%C3%A9mip%20l%C3%A9gique-Blocq-Marinesco/84e81f799e3e6976f6609e5465f4b6e0f469d421>.
9. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211. doi:10.1016/s0197-4580(02)00065-9
10. Brandel, J. -P., A. -G. Corbillé, P. Derkinderen, et S. Haïk. « La maladie de Parkinson est-elle une maladie à prion ? » *Revue Neurologique* 171, n° 12 (1 décembre 2015): 812-24. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.005>.
11. Burré, Jacqueline, Manu Sharma, et Thomas C. Südhof. « Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8, n° 3 (mars 2018). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024091>.
12. Cferazzi - « Traitements de la maladie de Parkinson et recherche — Site des ressources d'ACCES pour enseigner la Science de la Vie et de la Terre ». <http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/neurosciences/actualisation-des-connaissances/maladies-et-traitements/parkinson/les-traitements>.
13. Charcot, Jean Martin. *Leçons sur les maladies du système nerveux*. Delahaye et Lecrosnier, 1877.
14. Conway, Kelly A., Seung-Jae Lee, Jean-Christophe Rochet, Tomas T. Ding, Robin E. Williamson, et Peter T. Lansbury. « Acceleration of oligomerization, not fibrillization,

is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, n° 2 (18 janvier 2000): 571-76.

15. Delenclos M, Faroqi AH, Yue M, et al. Neonatal AAV delivery of alpha-synuclein induces pathology in the adult mouse brain. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5(1):51. Published 2017 Jun 23. doi:10.1186/s40478-017-0455-3
16. DeMaagd, George, et Ashok Philip. « Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis ». *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* 40, n° 8 (août 2015): 504-32.
17. Donaghy, Paul C, et Ian G McKeith. « The clinical characteristics of dementia with Lewy bodies and a consideration of prodromal diagnosis ». *Alzheimer's Research & Therapy* 6, n° 4 (21 juillet 2014): 46. <https://doi.org/10.1186/alzrt274>.
18. Doty, Richard L., Paul Shaman, et Dann Michael. « University of Pennsylvania Smell Identification Test ». American Psychological Association, 10 avril 2017. <https://doi.org/10.1037/t21403-000>.
19. Earls, Rachael H., Kelly B. Menees, Jaegwon Chung, James Barber, Claire-Anne Gutekunst, Manuel G. Hazim, et Jae-Kyung Lee. « Intrastriatal Injection of Preformed Alpha-Synuclein Fibrils Alters Central and Peripheral Immune Cell Profiles in Non-Transgenic Mice ». *Journal of Neuroinflammation* 16, n° 1 (3 décembre 2019): 250. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1636-8>.
20. Emamzadeh, Fatemeh Nouri. « Alpha-Synuclein Structure, Functions, and Interactions ». *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences* 21 (2016): 29. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>.
21. Fernagut, P.O., C.B. Hutson, S.M. Fleming, N.A. Tetreaut, J. Salcedo, E. Masliah, et M.F. Chesselet. « Behavioral and Histopathological Consequences of Paraquat Intoxication in Mice: Effects of α -Synuclein Over-Expression ». *Synapse (New York, N.Y.)* 61, n° 12 (décembre 2007): 991-1001. <https://doi.org/10.1002/syn.20456>.
22. Flores-Cuadrado, Alicia, Isabel Ubeda-Bañon, Daniel Saiz-Sanchez, Carlos de la Rosa-Prieto, et Alino Martinez-Marcos. « Hippocampal α -Synuclein and Interneurons in Parkinson's Disease: Data from Human and Mouse Models ». *Movement Disorders* 31, n° 7 (2016): 979-88. <https://doi.org/10.1002/mds.26586>.
23. Fujiwara, Hideo, Masato Hasegawa, Naoshi Dohmae, Akiko Kawashima, Eliezer Masliah, Matthew S. Goldberg, Jie Shen, Koji Takio, et Takeshi Iwatsubo. « Alpha-Synuclein Is Phosphorylated in Synucleinopathy Lesions ». *Nature Cell Biology* 4, n° 2 (février 2002): 160-64. <https://doi.org/10.1038/ncb748>.
24. Galasko, Douglas. « Lewy Body Disorders ». *Neurologic clinics* 35, n° 2 (mai 2017): 325-38. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.01.004>.
25. Gao, Fei, Jia Yang, Dongdong Wang, Chao Li, Yi Fu, Huaishan Wang, Wei He, et Jianmin Zhang. « Mitophagy in Parkinson's Disease: Pathogenic and Therapeutic Implications ». *Frontiers in Neurology* 8 (2017): 527. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00527>.
26. Ghosh, Dhiman, Surabhi Mehra, Shruti Sahay, Pradeep K. Singh, et Samir K. Maji. « α -Synuclein Aggregation and Its Modulation ». *International Journal of Biological Macromolecules* 100 (juillet 2017): 37-54. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.021>.

27. Giasson, B. I., et V. M. Lee. « A New Link between Pesticides and Parkinson's Disease ». *Nature Neuroscience* 3, n° 12 (décembre 2000): 1227-28.
<https://doi.org/10.1038/81737>.
28. Giasson, Benoit I., John E. Duda, Shawn M. Quinn, Bin Zhang, John Q. Trojanowski, et Virginia M.-Y. Lee. « Neuronal Alpha-Synucleinopathy with Severe Movement Disorder in Mice Expressing A53T Human Alpha-Synuclein ». *Neuron* 34, n° 4 (16 mai 2002): 521-33. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00682-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00682-7).
29. Goetz, Christopher G. « The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*: 1, n° 1 (septembre 2011). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>.
30. Gomperts, Stephen N. « Lewy Body Dementias: Dementia With Lewy Bodies and Parkinson Disease Dementia ». *Continuum : Lifelong Learning in Neurology* 22, n° 2 Dementia (avril 2016): 435-63. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000309>.
31. Hershey, Linda A., et Rhonda Coleman-Jackson. « Pharmacological Management of Dementia with Lewy Bodies ». *Drugs & Aging* 36, n° 4 (2019): 309-19.
<https://doi.org/10.1007/s40266-018-00636-7>.
32. Jellinger, Kurt A. « A Critical Evaluation of Current Staging of α -Synuclein Pathology in Lewy Body Disorders ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Parkinson's Disease, 1792, n° 7 (1 juillet 2009): 730-40.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.07.006>.
33. Jellinger, « Multiple System Atrophy: An Oligodendroglioneuronal Synucleinopathy1 ». *Journal of Alzheimer's Disease* 62, n° 3 (s. d.): 1141-79. <https://doi.org/10.3233/JAD-170397>.
34. Kamel, F., C. M. Tanner, D. M. Umbach, J. A. Hoppin, M. C. R. Alavanja, A. Blair, K. Comyns, et al. « Pesticide Exposure and Self-Reported Parkinson's Disease in the Agricultural Health Study ». *American Journal of Epidemiology* 165, n° 4 (15 février 2007): 364-74. <https://doi.org/10.1093/aje/kwk024>.
35. Kamp, Frits, Nicole Exner, Anne Kathrin Lutz, Nora Wender, Jan Hegermann, Bettina Brunner, Brigitte Nuscher, et al. « Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1 ». *The EMBO Journal* 29, n° 20 (20 octobre 2010): 3571-89. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.223>.
36. Khalil Richard– L'histoire de la maladie de Parkinson-
<https://www.biusante.parisdescartes.fr/sfhm/hsm/HSMx1996x030x002/HSMx1996x030x002x0215.pdf>
37. Langston, J. W., et P. A. Ballard. « Parkinson's Disease in a Chemist Working with 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetrahydropyridine ». *The New England Journal of Medicine* 309, n° 5 (4 août 1983): 310. <https://doi.org/10.1056/nejm198308043090511>.
38. Langston, J. William. « The MPTP Story ». *Journal of Parkinson's Disease* 7, n° Suppl 1 (s. d.): S11-19. <https://doi.org/10.3233/JPD-179006>.
39. Lau, A., So, R.W.L., Lau, H.H.C. et al. α -Synuclein strains target distinct brain regions and cell types. *Nat Neurosci* 23, 21–31 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41593-019-0541->
40. Li, Jia-Yi, Elisabet Englund, Janice L. Holton, Denis Soulet, Peter Hagell, Andrew J. Lees, Tammarnyn Lashley, et al. « Lewy Bodies in Grafted Neurons in Subjects with Parkinson's Disease Suggest Host-to-Graft Disease Propagation ». *Nature Medicine* 14, n° 5 (mai 2008): 501-3. <https://doi.org/10.1038/nm1746>.
41. Lim, Kah-Leong, et Jeanne M. M. Tan. « Role of the Ubiquitin Proteasome System in Parkinson's Disease ». *BMC Biochemistry* 8 Suppl 1 (22 novembre 2007): S13.
<https://doi.org/10.1186/1471-2091-8-S1-S13>.

42. Lohmann, Stephanie, Maria E. Bernis, Babila J. Tachu, Alexandra Ziemski, Jessica Grigoletto, et Gültekin Tamgüney. « Oral and Intravenous Transmission of α -Synuclein Fibrils to Mice ». *Acta Neuropathologica* 138, n° 4 (1 octobre 2019): 515-33. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02037-5>.
43. Luk, Kelvin C., Victoria M. Kehm, Bin Zhang, Patrick O'Brien, John Q. Trojanowski, et Virginia M.Y. Lee. « Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 209, n° 5 (7 mai 2012): 975-86. <https://doi.org/10.1084/jem.20112457>.
44. Manning-Bog, Amy B., Alison L. McCormack, Jie Li, Vladimir N. Uversky, Anthony L. Fink, et Donato A. Di Monte. « The Herbicide Paraquat Causes Up-Regulation and Aggregation of Alpha-Synuclein in Mice: Paraquat and Alpha-Synuclein ». *The Journal of Biological Chemistry* 277, n° 3 (18 janvier 2002): 1641-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100560200>.
45. Maroteaux, L, Jt Campanelli, et Rh Scheller. « Synuclein: A Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal ». *The Journal of Neuroscience* 8, n° 8 (1 août 1988): 2804-15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-08-02804.1988>.
46. Massano, João, et Kailash P. Bhatia. « Clinical Approach to Parkinson's Disease: Features, Diagnosis, and Principles of Management ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, n° 6 (juin 2012): a008870. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008870>.
47. McBride, P. A., W. J. Schulz-Schaeffer, M. Donaldson, M. Bruce, H. Diringer, H. A. Kretzschmar, et M. Beekes. « Early Spread of Scrapie from the Gastrointestinal Tract to the Central Nervous System Involves Autonomic Fibers of the Splanchnic and Vagus Nerves ». *Journal of Virology* 75, n° 19 (octobre 2001): 9320-27. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.19.9320-9327.2001>.
48. Mendez, Ivar, Angel Viñuela, Arnar Astradsson, Karim Mukhida, Penelope Hallett, Harold Robertson, Travis Tierney, et al. « Dopamine Neurons Implanted into People with Parkinson's Disease Survive without Pathology for 14 Years ». *Nature Medicine* 14, n° 5 (mai 2008): 507-9. <https://doi.org/10.1038/nm1752>.
49. Mougnot, Anne-Laure, Simon Nicot, Anna Bencsik, Eric Morignat, Jérémy Verchère, Latefa Lakhdar, Stéphane Legastelois, et Thierry Baron. « Prion-like Acceleration of a Synucleinopathy in a Transgenic Mouse Model ». *Neurobiology of Aging* 33, n° 9 (septembre 2012): 2225-28. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.022>.
50. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 2008;183(5):795-803. doi:10.1083/jcb.200809125
51. Naudet N, Antier E, Gaillard D, et al. Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α -Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α -Synuclein Transgenic Mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017;76(12):1046-1057. doi:10.1093/jnen/nlx092
52. Neumann, Manuela, Philipp J. Kahle, Benoit I. Giasson, Laurence Ozmen, Edilio Borroni, Will Spooren, Veronika Müller, et al. « Misfolded Proteinase K-Resistant Hyperphosphorylated Alpha-Synuclein in Aged Transgenic Mice with Locomotor Deterioration and in Human Alpha-Synucleinopathies ». *The Journal of Clinical Investigation* 110, n° 10 (novembre 2002): 1429-39. <https://doi.org/10.1172/JCI15777>.
53. Nicot, Simon, Jérémy Verchère, Maxime Bélondrade, Charly Mayran, Dominique Bétemps, Daisy Bougard, et Thierry Baron. « Seeded Propagation of α -Synuclein

- Aggregation in Mouse Brain Using Protein Misfolding Cyclic Amplification ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33, n° 11 (2019): 12073-86.
<https://doi.org/10.1096/fj.201900354R>.
54. Norris, Erin H., Kunihiro Uryu, Susan Leight, Benoit I. Giasson, John Q. Trojanowski, et Virginia M. -Y. Lee. « Pesticide Exposure Exacerbates α -Synucleinopathy in an A53T Transgenic Mouse Model ». *The American Journal of Pathology* 170, n° 2 (1 février 2007): 658-66.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060359>.
 55. Ordenstein Wellcome Collection. « Sur La Paralysie Agitante et La Sclérose En Plaques Généralisée ». <https://wellcomecollection.org/works/mumk35hw/items?sierraId=b22272288>
 56. Oueslati, Abid. « Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? » *Journal of Parkinson's Disease* 6, n° 1 (s. d.): 39-51. <https://doi.org/10.3233/JPD-160779>.
 57. Paillusson, Sébastien, Patricia Gomez-Suaga, Radu Stoica, Daniel Little, Paul Gissen, Michael J. Devine, Wendy Noble, Diane P. Hanger, et Christopher C. J. Miller. « α -Synuclein Binds to the ER-Mitochondria Tethering Protein VAPB to Disrupt Ca²⁺ Homeostasis and Mitochondrial ATP Production ». *Acta Neuropathologica* 134, n° 1 (2017): 129-49. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1704-z>.
 58. Palma, Jose-Alberto, Lucy Norcliffe-Kaufmann, et Horacio Kaufmann. « Diagnosis of multiple system atrophy ». *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 211 (mai 2018): 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.10.007>.
 59. Park, Sang Myun, Han Young Jung, Thomas D. Kim, Jeon Han Park, Chul-Hak Yang, et Jongsun Kim. « Distinct Roles of the N-Terminal-Binding Domain and the C-Terminal-Solubilizing Domain of α -Synuclein, a Molecular Chaperone ». *Journal of Biological Chemistry* 277, n° 32 (8 septembre 2002): 28512-20.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111971200>.
 60. Parkinson, James. « An Essay on the Shaking Palsy ». *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 2002, 14.
 61. Phillips, Robert J., Gary C. Walter, Sarah L. Wilder, Elizabeth A. Baronowsky, et Terry L. Powley. « alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: autonomic pathway implicated in parkinson's disease? » *Neuroscience* 153, n° 3 (15 mai 2008): 733-50.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.074>.
 62. Pouchieu, Camille, Clément Piel, Camille Carles, Anne Gruber, Catherine Helmer, Séverine Tual, Elisabeth Marcotullio, Pierre Lebailly, et Isabelle Baldi. « Pesticide Use in Agriculture and Parkinson's Disease in the AGRICAN Cohort Study ». *International Journal of Epidemiology* 47, n° 1 (1 février 2018): 299-310.
<https://doi.org/10.1093/ije/dyx225>.
 63. Przedborski, S., Q. Chen, M. Vila, B. I. Giasson, R. Djaldatti, S. Vukosavic, J. M. Souza, V. Jackson-Lewis, V. M. Lee, et H. Ischiropoulos. « Oxidative Post-Translational Modifications of Alpha-Synuclein in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) Mouse Model of Parkinson's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 76, n° 2 (janvier 2001): 637-40. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00174.x>.
 64. Richardson, Jason R., Vanessa Fitsanakis, Remco H. S. Westerink, et Anumantha G. Kanthasamy. « Neurotoxicity of Pesticides ». *Acta Neuropathologica* 138, n° 3 (1 septembre 2019): 343-62. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>.

65. Hostiuc, Drima E, et Buda O. « Shake the Disease. Georges Marinesco, Paul Blocq and the Pathogenesis of Parkinsonism, 1893. » *Frontiers in Neuroanatomy* 10 (24 juin 2016): 74-74. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00074>.
66. Sargent D, Verchère J, Lazizzera C, et al. 'Prion-like' propagation of the synucleinopathy of M83 transgenic mice depends on the mouse genotype and type of inoculum [published correction appears in *J Neurochem*. 2018 Jul;146(2):199]. *J Neurochem*. 2017;143(1):126-135. doi:10.1111/jnc.14139
67. Schell, H., T. Hasegawa, M. Neumann, et P. J. Kahle. « Nuclear and Neuritic Distribution of Serine-129 Phosphorylated Alpha-Synuclein in Transgenic Mice ». *Neuroscience* 160, n° 4 (2 juin 2009): 796-804. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.002>.
68. Siddiqui, Irum Javaid, Nashaiman Pervaiz, et Amir Ali Abbasi. « The Parkinson Disease gene SNCA: Evolutionary and structural insights with pathological implication ». *Scientific Reports* 6 (15 avril 2016). <https://doi.org/10.1038/srep24475>.
69. Sorrentino ZA, Giasson BI. The emerging role of α -synuclein truncation in aggregation and disease. *J Biol Chem*. 2020;295(30):10224-10244. doi:10.1074/jbc.REV120.011743
70. Souza, José M., Benoit I. Giasson, Virginia M.-Y. Lee, et Harry Ischiropoulos. « Chaperone-like Activity of Synucleins ». *FEBS Letters* 474, n° 1 (2000): 116-19. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01563-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01563-5).
71. Stott, Simon R W. « The wrong James Parkinson ». *Practical Neurology* 15, n° 2 (avril 2015): 148-148. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2014-001043>.
72. Tanji, Kunikazu, Fumiaki Mori, Junsei Mimura, Ken Itoh, Akiyoshi Kakita, Hitoshi Takahashi, et Koichi Wakabayashi. « Proteinase K-Resistant Alpha-Synuclein Is Deposited in Presynapses in Human Lewy Body Disease and A53T Alpha-Synuclein Transgenic Mice ». *Acta Neuropathologica* 120, n° 2 (août 2010): 145-54. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0676-z>.
73. Vicario, Mattia, Domenico Cieri, Marisa Brini, et Tito Calì. « The Close Encounter Between Alpha-Synuclein and Mitochondria ». *Frontiers in Neuroscience* 12 (7 juin 2018): 388. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00388>.
74. Walusinski, O. « Jean-Martin Charcot and Parkinson's Disease: Teaching and Teaching Materials ». *Revue Neurologique* 174, no 7-8 (septembre 2018): 491-505. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.08.005>.
75. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Apr;508(1) 1-12. doi:10.1016/j.abb.2010.12.017. PMID: 21176768; PMCID: PMC3065393.
76. Bétemps D, Verchère J, Brot S, et al. Alpha-synuclein spreading in M83 mice brain revealed by detection of pathological α -synuclein by enhanced ELISA. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:29. Published 2014 Mar 13. doi:10.1186/2051-5960-2-29