

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE
Discipline : Biomolécule, pharmacologie, thérapeutique
Spécialité : Neurologie

Elodie CUVELIER

**Caractérisation métabolique et modulation
pharmacologique de l'activité glucocérébrosidase
dans un modèle murin surexprimant l' α -synucléine.**

Thèse dirigée par M. le Dr Karim BELARBI

Soutenue le 28 février 2019

Jury :

Mme le Dr Olga CORTI, Rapporteur

Mr le Dr Stéphane HUNOT, Rapporteur

Mme le Dr Nadia BELMATOUG, Examineur

Mr le Pr Bernard GRESSIER, Examineur

Mme le Dr Marie-Christine CHARTIER-HARLIN, Examineur

Mr le Dr Karim BELARBI, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

A Madame le Docteur Olga Corti et à Monsieur le Docteur Stéphane Hunot,

Vous me faites l'honneur de juger et d'être rapporteurs de mon travail de thèse et je vous en remercie sincèrement. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Nadia Belmatoug,

Je vous remercie d'avoir participé au jugement de mon travail. Merci de me faire l'honneur de votre présence.

A Monsieur le Professeur Bernard Gressier,

Je vous prie de croire en mes sincères et respectueux remerciements. Un grand merci pour votre aide, votre disponibilité, votre écoute, et les conseils avisés que vous avez pu me transmettre tout au long de la thèse et même encore aujourd'hui. Recevez ici toute ma gratitude.

A Madame le Docteur Marie-Christine Chartier-Harlin,

Je vous remercie de m'avoir permis d'effectuer ce travail de recherche au sein de votre équipe « Stades précoces de la maladie de Parkinson ». J'ai énormément appris pendant ces quatre années. Merci pour vos conseils, votre écoute et votre soutien. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Karim Belarbi,

Vous m'avez fait l'honneur d'encadrer ce travail de thèse. Je vous remercie de m'avoir permis de travailler sur ce projet scientifique très intéressant et formateur. Grâce à vous, j'ai enrichi mes connaissances dans le domaine de la neuropharmacologie, gagné en autonomie dans la réalisation de ce projet et développé mon esprit critique. Ceci m'a donné l'envie de continuer dans le domaine de la recherche. Recevez ici toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Luc Buée,

Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de votre Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert. Je garderai un souvenir inoubliable de ce travail au sein de votre établissement.

A Madame le Docteur Morvane Colin et le Docteur Christophe Lefebvre,

Vous m'avez fait l'honneur de faire partie de mon Comité de Suivi Individuel de Thèse. Merci pour votre disponibilité et vos conseils. Je vous prie de croire en mes sincères et respectueux remerciements.

A Monsieur le Docteur Jean-Marc Taymans,

Je vous remercie pour vos conseils, votre écoute et votre bonne humeur.

A Madame le Docteur Christel Vanbesien-Maillot et Madame le Docteur Odile Viltart, Je vous remercie pour vos conseils dès mon arrivée en master 2.

Je remercie sincèrement toutes les personnes qui m'ont aidé à concrétiser ce travail,

A Madame Nathalie Jouy et Madame Emilie Floquet d'avoir été présentes lors de mes expériences en cytométrie en flux. Un grand merci à Nathalie pour tous tes conseils et ta disponibilité sans faille, avec la bonne humeur et le sourire. Je garderai un souvenir inoubliable de ces expériences. Mille Mercis !

A Madame Delphine Taillieu, Monsieur Romain Dehaynin et toute l'équipe EOPS qui ont permis ce travail réalisable grâce à l'hébergement des animaux. Merci à vous, toujours disponibles en cas de besoin.

A Madame le Docteur Charlotte Laloux, qui m'a aidé dans l'analyse et la critique des différents tests comportementaux. Merci pour ta disponibilité et tes précieux conseils.

A Monsieur le Docteur Mathieu Méquinion et Madame le Docteur Emilie Caron, merci pour vos conseils en métabo, et merci Mathieu pour ton aide en immunohistochimie.

A Madame Raphaëlle Caillierez, merci pour ton aide et ta disponibilité lors de la mise au point des tests ELISA.

A Monsieur le Docteur David Blum et Madame le Docteur Emilie Faivre, je vous remercie pour vos conseils lors de la mise au point de WB associée à l'insuline.

A Monsieur le Docteur Xavier Thuru, merci pour vos conseils lors de la réalisation de la technique de FRET.

A Madame le Docteur Claire Pinçon, merci pour vos conseils et votre aide pour mes travaux de thèse.

A Madame Christine Bourgois, merci de ton aide et de ta disponibilité lors de la finalisation de cette thèse.

A Madame le Docteur Céline Brand, Madame Michèle Revez, Madame Nathalie Perrais, Madame Sophie Lesage, merci pour votre disponibilité et votre aide. Merci à Céline Brand de m'avoir permis de réaliser au mieux mes expériences.

Je remercie les personnes avec qui j'ai travaillé pendant plusieurs années au labo,

A Pierre Semaille et Thomas Comptdaer, avec qui j'ai débuté l'aventure. Merci pour votre disponibilité, votre accueil, votre bonne humeur et tout ce qu'on a pu partager ! Petit mot à Thomas ou « dieu », qui retrouvait si facilement toutes les petites choses que je recherchais dans le labo.

A Madame le Docteur Aliçia Ruelle-Stiévenard et Madame le Docteur Aurore Nkiliza, avec qui j'ai débuté ma thèse. Merci pour vos conseils et votre bonne humeur (et encore aujourd'hui). Merci pour votre sens de la critique, notamment Aurore sur les PCR, un souvenir inoubliable !

A William Sibran, un énorme merci pour tout ! Pour ton aide et tes conseils lors des manip animaux et des WB, pour ta bonne humeur, ton écoute et ton soutien à toute épreuve ! Je ne trouverai pas les mots pour exprimer tout cela... mais vraiment Merci pour tout ! (merci aussi pour Grave, Sam et moi en gardons un incroyable souvenir).

A Madame le Docteur Hélène Carrié, merci pour ton aide en CLHP et WB. Merci encore pour tes conseils, ton écoute et ta bonne humeur. Contentée de continuer à travailler en ta compagnie !

A Laurine Vandewynckel, merci pour ta bonne humeur et pour nos expériences communes en WB, qui ont pu me rassurer ! Grâce à toi le yuzu m'est familier.

A Madame le Docteur Coline Leghay, la dernière arrivée pendant ma thèse ! Merci pour ton écoute, tes conseils lors des dernières expériences réalisées. Merci également pour ton aide lors de la préparation du jour J ! Un grand merci !

Je remercie les étudiants du labo,

A Cécile Phan, merci pour ton écoute et ton aide lors des manipulations en cytométrie en flux. Merci pour ton sourire et ta bonne humeur à toute épreuve.

A Antoine Marchand, merci pour ta compagnie dans ce bureau. Et encore désolé pour toutes les questions auxquelles je n'ai pas su te répondre.

A Alessia Sarchione, merci pour ta bonne humeur et ton sourire ! Grâce à toi j'ai pu améliorer mon anglais au labo.

A Matthieu Drouyer, avec deux t, merci pour ces années où nous avons réalisé ensemble notre thèse, dans les bons et les moins bons moments.

Je remercie mes collègues,

A Madame le Docteur Fanny Moreau et Madame le Docteur Chloé Delannoy-Rousselière, merci de m'avoir permis d'optimiser mon temps pendant ce début d'assistantat et de votre soutien. Merci encore Fanny pour ton écoute et ton aide tout au long de cette année.

A Madame le Docteur Stéphanie Genay, merci pour ton soutien et ta bonne humeur !

Je remercie ma famille et mes proches,

A Sylvia, ma grande sœur, qui m'a toujours encouragée et qui m'a toujours soutenue ! Un grand merci pour tout ma soeur !

A Man et Hervé, merci à vous ! Vous m'avez fait confiance jusqu'au bout. Je suis fière d'avoir tenu mes promesses et d'avoir (enfin) terminé mes études.

A Mamie, qui a toujours cru en moi !

A toute ma famille, qui m'a permis d'évoluer et d'être ce que je suis aujourd'hui.

A la famille de Samuel, toujours à l'écoute, disponible et de bonne humeur !

A Samuel, j'ai de la chance d'être à tes côtés depuis toutes ces années. Merci de ton soutien, de ton aide et de ton écoute. Je ne te remercierai jamais assez !

Merci à **Seb, Anne-So, Jéré, Hélo** avec un H, **Le Mazingue** (qui m'a fait devenir Mac), **Margaux, Manu** et **Cha** : merci à vous tous, avec qui j'ai passé de très bons moments et avec qui j'espère en passer bien d'autres !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES	10
TABLE DES TABLEAUX	12
ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
I Généralités de la maladie de Parkinson.....	15
1. Signes cliniques	15
1.1 Les symptômes moteurs caractéristiques	15
1.2 Les autres symptômes de la maladie	16
1.2.1 Les signes cliniques apparaissant classiquement avant les signes moteurs caractéristiques 16	
1.2.2 Les signes cliniques apparaissant après les signes moteurs caractéristiques	18
2. Etiologie	18
2.1 Les facteurs génétiques	18
2.1.1 Facteurs génétiques associés aux formes familiales de maladie de Parkinson	18
2.1.2 Facteurs génétiques associés aux formes sporadiques de la maladie de Parkinson	20
2.1.3 Les gènes <i>LRRK2</i> et <i>SNCA</i> , impliqués dans les formes génétiques et sporadiques de la maladie de Parkinson.....	20
2.1.4 La présence d'une mutation dans le gène <i>GBA1</i> , facteur de risque fréquemment associé aux formes sporadiques de maladie de Parkinson	22
2.2 Les facteurs environnementaux	23
3. Mécanismes physiopathologiques de la maladie	25
3.1 Les lésions de la maladie de Parkinson.....	25
3.1.1 La neurodégénérescence dopaminergique	25
3.1.2 Les corps de Lewy et l' α -synucléine.....	26
3.1.3 La neuroinflammation	29
3.2 Les autres facteurs pouvant intervenir dans la physiopathologie.....	30
3.2.1 Le stress du réticulum endoplasmique	30
3.2.2 L'altération de la voie autophagie-lysosome	31
3.2.3 Le stress oxydant	32
3.2.4 Le dérèglement de la fonction mitochondriale	32
3.2.5 Troubles de l'homéostasie calcique.....	33
4. Prise en charge thérapeutique.....	33
4.1 Les traitements symptomatiques actuels en France	33
4.2 Modélisation de la maladie de Parkinson et pistes thérapeutiques	35
4.2.1 Les modèles <i>in vivo</i> de la maladie de Parkinson.....	35

4.2.2	Pistes thérapeutiques	41
II	La place du métabolisme lipidique dans les maladies neurodégénératives	43
1.	La prise alimentaire et le métabolisme énergétique dans les maladies neurodégénératives	43
2.	Généralités des sphingolipides	45
2.1	Le métabolisme des sphingolipides	45
2.2	La distribution et le rôle des sphingolipides	46
3.	Les atteintes neurologiques associées à une maladie de surcharge lysosomale	48
3.1	Définition d'une maladie de surcharge lysosomale	48
3.2	Signes cliniques neurologiques associés aux principales maladies de surcharge lysosomale..	50
3.2.1	La maladie de Gaucher	50
3.2.2	La maladie de Fabry	51
3.2.3	La maladie de Niemann-Pick.....	51
3.2.4	Les gangliosidoses.....	52
3.2.5	La maladie de Tay-Sachs et de Sandhoff	52
4.	La glucocérébrosidase dans la maladie de Parkinson	53
4.1	Dérégulation de la glucocérébrosidase dans la maladie de Parkinson	53
4.2	Mécanismes communs potentiellement impliqués dans la maladie de Parkinson et les maladies de surcharge lysosomale	54
4.2.1	Les formes pathologiques de l'α-synucléine	54
4.2.2	L'inflammation	55
4.2.3	La voie autophagie-lysosome	56
4.2.4	Le stress oxydant	56
4.2.5	Dysfonction mitochondriale	56
4.2.6	L'homéostasie calcique.....	57
III	L'α-synucléine, la glucocérébrosidase et l'inflammation : un lien responsable d'une dérégulation précoce dans la maladie de Parkinson ?	57
1.	L'accumulation de l'α-synucléine et l'activation du système immunitaire : deux signes précoces engendrant le mécanisme physiopathologique de la maladie ?	58
1.1	Impact de l'α-synucléine sur l'inflammation	58
1.2	Impact de l'inflammation sur l'α-synucléine	59
2.	L'accumulation de l'α-synucléine et la diminution de l'activité de la glucocérébrosidase : un rétrocontrôle majorant les troubles de la maladie ?	59
2.1	Impact de la diminution de l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase lysosomale sur l'α-synucléine.....	60
2.1.1	Accumulation de l'α-synucléine.....	60
2.1.2	Formes pathologiques de l'α-synucléine	60
2.2	Impact de l'accumulation de l'α-synucléine sur l'activité de la glucocérébrosidase	61

2.2.1	Dérégulation du trafic réticulum endoplasmique-Golgi	61
2.2.2	Dérégulation de la dégradation protéique de la glucocérébrosidase lysosomale.....	62
3.	La diminution de l'activité glucocérébrosidase et l'inflammation : un mécanisme précoce majorant les troubles de la maladie ?	62
3.1	Trouble de l'autophagie	62
3.2	Impact des métabolites de la glucocérébrosidase	63
OBJECTIF.....		65
MATERIEL ET METHODES		66
I	Expérimentation animale sur le modèle murin transgénique Thy1-aSYN.....	66
1.	Le modèle Thy1-aSYN	66
2.	Hébergement des souris	67
3.	Génotypage des souris.....	67
4.	Traitement des souris	68
5.	Analyse de la composition corporelle.....	69
6.	Analyse de l'activité ambulatoire, de la consommation de nourriture et de la dépense énergétique en cage métabolique.....	69
7.	Tests comportementaux.....	70
7.1	Tests utilisés pour évaluer la motricité fine	71
7.1.1	Le test de la traversée de la poutre ou <i>challenging beam traversal test</i>	71
7.1.2	Le pole test	71
7.1.3	Test du retrait de l'adhésif.....	72
7.2	Tests utilisés pour évaluer l'olfaction : le test olfactif habituation/déshabituaton	72
8.	Euthanasie.....	73
II	Biochimie.....	73
1.	Extraction de protéines.....	73
2.	Western-Blot.....	73
3.	ELISA.....	75
4.	FRET.....	76
5.	Mesure de l'activité glucocérébrosidase	77
6.	Mesure de la glycémie	77
III	Cytométrie en flux.....	77
IV	Spectrométrie de masse et chromatographie en couche mince.....	80
V	Statistiques	82
RESULTATS		83
I	CARACTERISATION DU MODELE.....	83
1.	Troubles moteurs et non moteurs chez le modèle murin Thy1-aSYN.....	83

1.1	Troubles de la motricité fine dès l'âge de 3 mois	83
1.2	Trouble olfactif dès l'âge de 3 mois.....	85
1.3	Masse corporelle moindre dès 3 mois, perdurant avec le temps	85
2.	Troubles métaboliques du modèle murin Thy1-aSYN	86
2.1	Masse grasse plus faible à l'âge de 6 mois	86
2.2	Consommation de boisson et de nourriture moins importante	87
2.3	Activité physique et énergie libérée majorées	89
2.4	Taux de glycémie et de leptinémie plus faibles.....	90
2.5	Surexpression de l'α-synucléine dans l'hypothalamus, associée à une dérégulation de STAT3 et de la voie mTOR.....	91
3.	Etude du système immunitaire du modèle murin Thy1-aSYN.....	92
II	Modulation pharmacologique de l'activité cérébrale de la glucocérebrosidase	95
1.	Modulation de l'activité de la glucocérebrosidase cérébrale par le traitement par le miglustat et le conduritol-β-époxyde	95
2.	Impact de cette modulation sur les troubles non moteurs des souris Thy1-aSYN.....	97
3.	Impact de cette modulation sur les taux plasmatiques et cérébraux d'α-synucléine.....	98
4.	Impact de cette modulation sur la voie de signalisation mTOR et l'autophagie.....	99
5.	Impact de la modulation sur l'inflammation	100
	DISCUSSION.....	103
I	Evolution des populations du système immunitaire	106
1.	Evolution en fonction de l'âge des populations du système immunitaire au niveau périphérique	107
2.	Evolution des populations du système immunitaire au niveau central	109
II	Le phénotype des souris Thy1-aSYN dès 3 mois	110
III	Les souris transgéniques présentent des troubles métaboliques	113
1.	Composition corporelle	113
2.	Caractérisation du phénotype métabolique.....	114
3.	Etude de l'accumulation de l'α-synucléine et de la voie de signalisation mTOR dans l'hypothalamus	116
IV	Impact de la modulation pharmacologique de l'activité glucocérebrosidase dans le modèle murin Thy1-aSYN.....	118
1.	Modulation pharmacologique par le miglustat et le conduritol-β-époxyde	119
2.	Impact du traitement par le miglustat et le conduritol-β-époxyde sur le métabolisme de la glucocérebrosidase.....	120
3.	Impact sur les troubles moteurs et non moteurs des souris transgéniques	121
4.	Impact sur l'accumulation centrale et périphérique de l'α-synucléine.....	122

5. Impact sur l'inflammation.....	123
V Conclusion	124
BIBLIOGRAPHIE.....	125
ANNEXES	177
I Communications écrites	177
II Communications orales	177
III Articles	178

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Symptômes cliniques lors de l'évolution de la maladie de Parkinson	17
Figure 2 : Représentation schématique des facteurs impliqués dans les cas sporadiques de la maladie de Parkinson.....	23
Figure 3 : Représentation du processus pathologique de la maladie de Parkinson	28
Figure 4 : Représentation du mode d'action des principales classes d'antiparkinsoniens.....	34
Figure 5 : Schématisation du métabolisme des gangliosides	46
Figure 6 : Représentation du lien suggéré entre l'accumulation de l' α -synucléine, la neuroinflammation et le métabolisme des glucocérebrosides dans la maladie de Parkinson	64
Figure 7 : Schéma récapitulatif des signes cliniques et histopathologiques observés dans le modèle murin Thy1-aSYN.....	67
Figure 8 : Composés pharmacologiques utilisés lors de cette étude.....	68
Figure 9 : Représentation des types cellulaires étudiés en fonction des anticorps utilisés lors de l'étude par cytométrie en flux.	78
Figure 10 : Le pole test réalisé chez les souris Thy1-aSYN et sauvages âgées de 12 mois.....	83
Figure 11 : Test de challenge de la poutre chez les souris Thy1-aSYN et sauvages âgées de 3, 6 et 12 mois	84
Figure 12 : Test du retrait de l'adhésif, réalisé chez des souris Thy1-aSYN et sauvages âgées de 3, 6 et 12 mois.....	84
Figure 14 : Masse corporelle en fonction de l'âge des souris Thy1-aSYN et WT	86
Figure 15 : Composition de la masse corporelle des souris Thy1-aSYN et WT à l'âge de 3, 6 et 12 mois.....	87
Figure 16 : Analyse de la prise alimentaire des souris âgées de 6 mois	88
Figure 17 : Activité physique, taux d'énergie libérée et ratio d'échange respiratoire chez les souris Thy1-aSYN et WT âgées de 6 mois	89
Figure 18 : Dosage plasmatique du glucose, de l'insuline et de la leptine chez les souris âgées de 6 mois.....	90
Figure 20 : Analyse par immunoempreinte de l'expression protéique de la voie mTOR dans l'hypothalamus des souris Thy1-aSYN et WT âgées de 6 mois	92

Figure 21 : Représentation des populations du système immunitaire périphérique étudié par cytométrie en flux dans le sang de souris âgées de 3, 6 et 12 mois.	93
Figure 22 : Représentation des populations du système immunitaire central étudié par cytométrie en flux dans le cerveau de souris âgées de 3, 6 et 12 mois	95
Figure 23 : Données obtenues lors de la quantification du miglustat par CLHP-SM dans le sang et le cerveau de souris traitées	96
Figure 24 : Evolution de l'activité de la glucocérébrosidase, de ses substrats et produits cérébraux suite à la modulation pharmacologique de la glucocérébrosidase	97
Figure 26 : Quantification protéique de l' α -synucléine cérébrale et sanguine.....	99
Figure 27 : Etude de la voie de signalisation mTOR et de l'activité autophagique par immuno-empreinte	100
Figure 28 : Représentation des populations du système immunitaire périphérique étudié par cytométrie en flux dans le sang de souris traitées par PBS, MIG et CBE	101
Figure 29 : Représentation des populations du système immunitaire central étudié par cytométrie en flux dans le cerveau des souris traitées par PBS, MIG et CBE	102
Figure 30 : Etude de l'expression protéique cérébrale de GFAP	102

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Loci associés aux formes monogéniques de la maladie de Parkinson... 19	19
Tableau II : Les maladies impliquant le métabolisme des glucosylsphingolipides 49	49
Tableau III : Références et conditions des anticorps utilisés par technique d'immuno- empreinte 75	75
Tableau IV : Références et conditions des anticorps utilisés lors de la cytométrie en flux..... 79	79

ABREVIATIONS

6-OHDA : 6-hydroxy-dopamine
ADN : acide désoxyribonucléique
AgRP : neurones *agouti related protein*
AMS : atrophie multi-systématisée
ARN : acde ribonucléique
aSYN P129S : α -synucléine phosphorylée sur son résidu de sérine en position 129
ATP : adénosine triphosphate
BHE : barrière hémato-encéphalique
BSA : albumine de sérum bovin
C1P : céramide-1-phosphate
CBE : conduritol- β -époxyde
CLHP-SM : chromatographie liquide à haute pression couplée à la spectrométrie de masse
CMH I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1
DA : dopamine
EE : énergie libérée
EOPS : exempt d'organisme pathogène spécifique
GalCer : galactosylcéramide
GBA : glucocérébrosidase
GlcCer : glucosylcéramide
HBSS : solution saline équilibrée de Hank
ICOMT : inhibiteur de la catéchol-O-méthyl-transférase
IDDC : inhibiteur de la dopa-décarboxylase
IFN γ : interféron gamma
IL : interleukine
IMAO-B : inhibiteur de la monoamine oxydase de type B
IMC : indice de masse corporelle
IP : intra-péritonéal
L-DOPA : lévodopa
Lc NK : lymphocyte natural killer
LDS : lithium docecyl sulfat
LPS : lipopolysaccharide
MIG : miglustat

MPTP : 1-méthyl-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MSL : maladie de surcharge lysosomale
mTOR : cible mécanistique de la rapamycine chez les mammifères
NADPH oxydase : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NOX 2 : NADPH oxydase de type 2
NPY : neurones à neuropeptide Y
PBS : tampon phosphate salin
POMC : pro-piomélanocortine
PVDF : polyvinylidene difluoride
RE : réticulum endoplasmique
RER : ratio d'échange respiratoire
ROS : espèces réactives à l'oxygène
RPMI : milieu de l'institut roswell park memorial
S1P : sphingosine-1-phosphate
TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha
VTA : aire ventrale tegmentale

INTRODUCTION

I Généralités de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative progressive qui atteint plus de 150000 personnes en France et plus de 6 millions de personnes à travers le monde [Elbaz et coll., 2016]. Elle représente la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. La maladie de Parkinson apparaît à un âge moyen de 58 ans et son incidence augmente avec l'âge. Ainsi, avec le vieillissement de la population, sa prévalence pourrait doubler d'ici 2030 [Dorsey et coll., 2007].

1. Signes cliniques

1.1 *Les symptômes moteurs caractéristiques*

James Parkinson a décrit cette pathologie en 1817 en la nommant paralysie agitante [Parkinson, 1817]. Le diagnostic repose sur la présence d'un ou plusieurs troubles moteurs appartenant à la triade parkinsonienne, terme qui regroupe les signes moteurs caractéristiques de la maladie.

Tout d'abord, le tremblement au repos est le signe pathognomonique : il est lent (de fréquence 4 à 6 Hertz) et unilatéral. Il est aggravé par les émotions ou par des efforts de concentration (comme le calcul mental) et disparaît lors de l'initiation d'un mouvement. Ce trouble, observé dans 70% des cas, a une valeur pronostic car il est associé à une évolution plus lente de la maladie.

Les patients peuvent de plus présenter une rigidité dite plastique, qui est une raideur des extrémités ou de la nuque par augmentation du tonus musculaire. Cette rigidité présente une résistance constante cédant par à-coups lors de la mobilisation passive, appelé phénomène de roue dentée.

Enfin, une bradykinésie et une akinésie sont caractérisées respectivement par un ralentissement à l'exécution et à l'initiation d'un mouvement. La gestualité automatique disparaît tels que les mimiques du visage laissant une expression faciale figée, et les gestes volontaires sont retardés et deviennent de plus en plus

rare. Les malades marchent à petits pas, présentent une micrographie, et ont des difficultés à réaliser les activités de la vie quotidienne.

Plus tardivement, l'apparition d'une instabilité posturale constitue le quatrième signe cardinal de la maladie.

Bien que la présence d'au moins deux de ces trois signes moteurs, observés de façon asymétrique, évoque le diagnostic de la maladie de Parkinson, ces troubles peuvent être également observés dans des syndromes parkinsoniens d'étiologie différente. Certains syndromes parkinsoniens sont atypiques car leur réponse au traitement dopaminergique est faible [Williams et coll., 2013]. Ils incluent l'atrophie multisystématisée (présentant de façon variable des signes parkinsoniens, cérébelleux, dysautonomiques et pyramidaux), la paralysie supranucléaire progressive (présentant un syndrome à prédominance axial, des troubles oculomoteurs et des troubles cognitifs précoces), la dégénérescence cortico-basale (présentant des signes corticaux tels qu'une apraxie, une aphasie et des troubles sensitifs), et la démence à corps de Lewy (présentant des troubles cognitifs et des démences précoces avec hallucinations). D'autre part, le syndrome parkinsonien peut être iatrogène, notamment par l'utilisation de neuroleptiques qui ont une action antagoniste sur les récepteurs dopaminergiques. Enfin, les syndromes parkinsoniens vasculaires sont la conséquence de lésions vasculaires multiples touchant les noyaux gris centraux [Vizcarra et coll., 2015].

1.2 *Les autres symptômes de la maladie*

1.2.1 *Les signes cliniques apparaissant classiquement avant les signes moteurs caractéristiques*

Des troubles non moteurs peuvent apparaître plusieurs années avant les troubles moteurs caractéristiques, et impacter fortement la qualité de vie des sujets atteints de la maladie de Parkinson [Berg et coll., 2013]. Ces signes cliniques sont à considérer, d'autant plus qu'ils pourraient contribuer à un diagnostic plus précoce de cette maladie [Berg et coll., 2015] (figure 1). Cependant, ces troubles sont fréquents dans la population générale et sont peu spécifiques de la maladie de Parkinson.

Plus d'une dizaine d'années avant l'apparition des troubles moteurs, un ralentissement digestif et une constipation peuvent apparaître chez 50 à 80% des malades. Puis, 6 à 9 ans avant les troubles moteurs, 30 à 50% des malades peuvent avoir des troubles du sommeil paradoxal avec une perte d'atonie musculaire, des

mouvements anormaux violents, et des cris correspondant à la thématique du rêve réalisé [Schenck et coll. 1986 ; Iranzo et coll., 2005 ; Marion et coll., 2008]. Les sujets présentant ce trouble du sommeil ont un risque plus important de développer une maladie de Parkinson : 40 à 65% des sujets développent une maladie neurodégénérative dix ans après l'apparition de ce signe [Iranzo et coll., 2006 ; Postuma et coll., 2009 ; Schenck et coll., 1996].

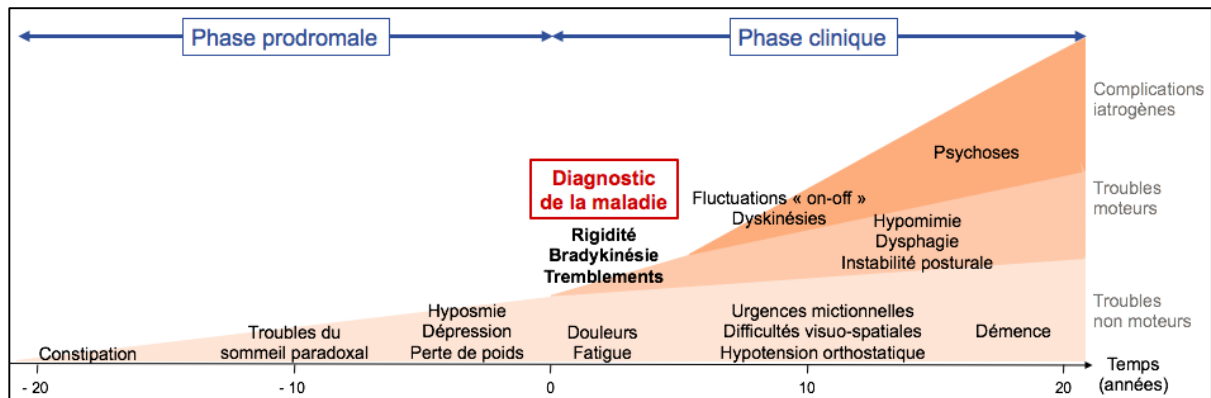


Figure 1 : Symptômes cliniques lors de l'évolution de la maladie de Parkinson. Le diagnostic, réalisé au temps 0, est précédé de différents troubles non moteurs. Avec l'évolution de la pathologie, de nombreux signes moteurs et non moteurs peuvent apparaître, ainsi que des complications iatrogènes démontrant les limites actuelles des thérapeutiques antiparkinsoniennes. Figure adaptée de Kalia et Lang, 2015.

Quelques années avant l'apparition des troubles moteurs caractéristiques, 30 à 40% des sujets parkinsoniens sont déprimés. Les patients déprimés ont un risque multiplié par deux de développer cette maladie, mais ce symptôme est peu spécifique car il est retrouvé chez 15% des sujets âgés [Leentjens et coll., 2003]. De plus, les sujets hyposmiques ont un risque multiplié par cinq de développer cette maladie neurodégénérative, mais ce symptôme est également peu spécifique car il est présent chez 80% des sujets parkinsoniens mais également chez 30% des sujets âgés [Haehner et coll., 2009 ; Ross et coll., 2008]. Enfin, certaines études rapportent chez ces malades une diminution de la masse corporelle, de l'adiposité et de l'Indice de masse corporelle (IMC) 5 ans avant l'apparition des troubles moteurs caractéristiques [Cheshire et Wszolek, 2005 ; Chen et coll., 2003 ; Durrieu et coll., 1992]. Cette perte de poids pourrait être associée à une plus grande sévérité des troubles moteurs et non moteurs de la maladie [Sharma et Vassallo, 2014 ; Van der Marck et coll., 2012]. Différentes étiologies peuvent expliquer cette perte de poids, telles qu'une diminution de la prise alimentaire liée à une perte d'appétit, des troubles de l'humeur, une hyposmie ou une constipation [Sheard et coll., 2011 ; Abbott et

coll., 1992 ; Lorefalt et coll., 2004]. D'autre part, la diminution plasmatique de la leptine, hormone digestive régulant le phénomène de satiété et les réserves de graisse dans l'organisme, pourrait également être à l'origine de cette perte de masse corporelle [Fischer et coll., 2010 ; Lorefalt et coll., 2009].

1.2.2 Les signes cliniques apparaissant après les signes moteurs caractéristiques

D'autres signes cliniques peuvent apparaître après le diagnostic de la maladie tels que des difficultés de déglutition, de mastication, de salivation, des urgences mictionnelles, des difficultés visuo-spatiales et plus tardivement une démence. L'apparition de ce trouble cognitif est plus fréquemment observée chez les sujets parkinsoniens âgés, déprimés, présentant des troubles du poids et du langage, et répondant faiblement à la L-dopa [Coelho et Ferreira, 2012].

2. Etiologie

On distingue classiquement les formes de maladie de Parkinson à transmission monogénique et celles, majoritaires, d'origine multifactorielle. A ce jour, différents facteurs génétiques et environnementaux ont été identifiés comme augmentant le risque de développer la maladie. Leur découverte nous permet d'émettre des hypothèses sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la neurodégénérescence associée à la maladie, et de développer des modèles expérimentaux.

2.1 Les facteurs génétiques

2.1.1 Facteurs génétiques associés aux formes familiales de maladie de Parkinson

Les formes familiales représentent environ 10% des cas de la maladie de Parkinson. Le tableau I représente les 22 loci associés à ces formes de la maladie de Parkinson. Le lien causal entre la présence de mutations dans le gène *SCNA* ou la multiplication du locus contenant le gène *SNCA* et les formes familiales de la maladie de Parkinson met en exergue le rôle de cette protéine dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. La présence de mutations dans des gènes codant des protéines impliquées dans les systèmes de dégradation tels que le

système ubiquitine protéasome (PRKN, UCHL1), l'autophagie (LRRK2) ou la fonction lysosomale (ATP13A2) souligne que des altérations des systèmes jouant un rôle dans la protéolyse cellulaire pourraient également être impliqués. L'association de gènes dont des mutations ayant trait au fonctionnement des mitochondries (PINK1, FBXO7) suggèrent que des altérations du métabolisme énergétique pourrait contribuer à la mort neuronale dans la maladie de Parkinson [Corti et coll., 2011].

Tableau I : Loci associés aux formes monogéniques de la maladie de Parkinson. D'après les revues de Michel et coll., 2016 et de Deng et coll., 2018. AD = hérédité autosomique dominante, AR = hérédité autosomique récessive.

Locus	Symbole du gène	Nom du gène	Localisation du gène	Type de transmission	Toxicité probable de l'altération de la protéine associée au gène	Accumulation d' α -synucléine
PARK1 Et PARK4	SNCA	α -synucléine	4q22.1	AD	Accumulation et agrégation d' α -synucléine neurotoxique [Poewe et coll., 2017]	Oui, présence de corps de Lewy
PARK2	PRKN	Parkine, ubiquitine ligase E3	6q26	AR	Altération du système ubiquitine-protéasome, accumulant des protéines neurotoxiques [Kalinderi et coll., 2016]	non
PARK3	PARK3	-	2p13	AD	Peu connu	Peu connu
PARK5	UCHL1	Ubiquitine hydrolase L1 en C-terminal	4p13	AD	Altération du système ubiquitine-protéasome, accumulant des protéines neurotoxiques [Kumar et coll., 2017]	non
PARK6	PINK1	Protéine kinase 1 induite par PTEN	1p36	AR	Altération de la fonction mitochondriale [Selrafi et coll., 2015]	non
PARK7	DJ-1	Déglycose associé au parkinsonisme	1p36.23	AR	Stress oxydant et altération du système ubiquitine-protéasome et de la fonction mitochondriale [Wilhelmus et coll., 2012]	non
PARK8	LRRK2	Protéine kinase 2 riche en leucine	12p11.2-q23.1	AD	Altération du trafic vésiculaire, de l'autophagie, du cytosquelette, de la synthèse protéique, et de la fonction lysosomale [Martin et coll., 2014]	Oui, présence de corps de Lewy
PARK9	ATP13A2	ATPase 13A2	1p36.13	AR	Altération de la fonction lysosomale [Demirsoy et coll., 2017 ; Hølemans et coll., 2015]	oui
PARK10	PARK10	-	1p32	inconnu	Peu connu	Peu connu
PARK11	GIGYF2	Protéine 2 GYF interagissant avec GRB10	2q37.1	AD	Altération de la voie de l'insuline : récepteurs et facteurs de croissance à l'insuline [Ruiz-Martinez et coll., 2015]	non
PARK12	PARK12	-	Xq21-q25	Liée à l'X	Peu connu	Peu connu
PARK13	HTRA2	Peptidase 2 serine Htra	2p13.1	AD	Altération de la fonction mitochondriale [Dagda et Chu, 2009]	non
PARK14	PLA2G6	Phospholipase A2 du groupe VI	22q13.1	AR	Altération de la fonction mitochondriale, peroxydation lipidique [Kingham et coll., 2015]	non
PARK15	FBXO7	Protéine F-box 7	22q12.3	AR	Altération de la fonction mitochondriale, majoration d'espèces réactifs à l'oxygène [Delgado-Camprubi et coll., 2017]	non
PARK16	PARK16	-	1q32	inconnu	Peu connu	Peu connu
PARK17	VPS35	VPS35, composant du complexe rétromère	16q11.2	AD	Altération du transport rétrograde des protéines entre les endosomes et le trans-Golgi [Deng et coll., 2013]	oui
PARK18	EIF4G1	Facteur eucaryote d'initiation de la traduction 4 gamma 1	3q27.1	AD	Altération de la traduction des ARNm codant des protéines de croissance, la survie cellulaire et la mitochondrie en réponse à un stress [Chartier-Harlin et coll., 2011 ; Deng et coll., 2015]	non
PARK19	DNAJC6	Membre C6 des protéines de choc thermique DnaJ [famille Hsp40]	1p31.3	AR	Altération des vésicules synaptiques et de leur recyclage par la voie de l'endocytose médiée par la clathrine [Yim et coll., 2010]	non
PARK20	SYNJ1	Synaptojanine 1	21q22.1	AR	Altération du recyclage des vésicules synaptiques [Cremona et coll., 1999]	non
PARK21	TMEM230	Protéine transmembranaire 230	20p13	AD	Altération du trafic de la sécrétion et du recyclage des vésicules [Deng et coll., 2016]	Oui, présence de corps de Lewy
PARK22	CHCHD2	Domaine 2 contenant des super hélices	7p11.2	AD	Altération de l'apoptose médiée à la mitochondrie, du métabolisme, de la phosphorylation oxydative, et de la migration cellulaire ou neuronale [Funayama et coll., 2015; Li et coll., 2016].	non
PARK23	VPS13C, RIC3	Homologue C protéine vacuolaire 13 Chaperon du récepteur acétylcholine RIC3	12q22.2 11p15.4	AR AD	Altération de la fonction mitochondriale [Lesage et coll., 2016] Altération, par les protéines chaperons, de la densité des récepteurs [Sudhama et coll., 2016]	non

2.1.2 Facteurs génétiques associés aux formes sporadiques de la maladie de Parkinson

Les formes sporadiques représentent environ 90% des cas de la maladie de Parkinson. Les études d'association ont révélé l'implication de loci associés à la forme sporadique de la maladie de Parkinson, dont les associations les plus importantes impliqueraient les gènes *GBA1*, *SNCA*, *LRRK2* et *MAPT* [Kalinderi et coll., 2016].

D'une part, le gène *MAPT* code pour une protéine tau associée aux microtubules. Cette protéine, fortement exprimée dans le cerveau, permet de stabiliser le cytosquelette et le transport axonal des neurones [Pascale et coll., 2016]. L'haplotype H1 du gène *MAPT* est associé à un risque plus important de développer la maladie de Parkinson par rapport à l'haplotype H2, et à la survenue plus fréquente de troubles cognitifs [Fagan et Pihlstrom, 2017 ; Wang et coll., 2016]. Les sujets parkinsoniens homozygotes à l'haplotype H1 ont une incidence plus importante de développer des corps de Lewy dans le neocortex [Pascale et coll., 2016 ; Caillet-Boudin et coll., 2015]. D'autre part, les gènes *GBA1*, *SNCA*, et *LRRK2* sont des facteurs majeurs observés dans des études d'association pangénomiques. Ainsi leurs descriptions sont donc présentées plus en détails ci-dessous.

2.1.3 Les gènes *LRRK2* et *SNCA*, impliqués dans les formes génétiques et sporadiques de la maladie de Parkinson

2.1.3.1 Le gène *LRRK2* codant une protéine kinase

Le gène *LRRK2* représente une cause génétique majeure de la maladie de Parkinson, où les mutations de ce gène sont responsables d'environ 10% des cas familiaux et 3,6% des cas sporadiques [Martin et coll., 2014 ; Corti et coll., 2011]. L'implication des mutations de *LRRK2* dans des formes sporadiques et génétiques de la maladie de Parkinson suggère que la transmission est autosomique dominante et de pénétrance incomplète [Martin et coll., 2014]. Environ 120 variants ont été décrits, mais de nombreuses mutations restent inconnues de part leur faible pénétrance et l'apparition tardive de la maladie [Ross et coll., 2011 ; Corti et coll., 2011].

Le gène *LRRK2* code pour une protéine kinase riche en leucine exprimée notamment dans différentes zones cérébrales tels que le striatum, l'hippocampe, le

cortex, le cervelet et les bulbes olfactifs [Kang et Marto, 2017]. Impliquée dans des formes familiales mais également dans des formes sporadiques, la mutation G2019S du gène *LRRK2*, responsable d'un gain de fonction de la protéine, augmente le nombre d'autophagosomes, le pH lysosomal et réduit l'activité enzymatique du lysosome [Gomez-Suaga et Hilfiker, 2012]. D'autre part, les mutations des gènes *LRRK2* impactent l'autophagie, tout comme les mutations responsables de la surexpression de l' α -synucléine, décrite plus tard dans l'introduction [Winslow et coll., 2010].

2.1.3.2 Le gène *SNCA*

L' α -synucléine est codée par le gène *SNCA*. Il s'agit d'une protéine composée d'une extrémité N-terminale membranaire par son domaine hélice α -amphipathique [Ozansoy et Basak, 2013 ; Deng et Yuan, 2014]. Alors que sa fonction physiologique est peu caractérisée, son accumulation et son agrégation est neurotoxique [Poewe et coll., 2017].

Polymeropoulos et son équipe identifièrent en 1996 ce locus, désigné comme PARK1, qui était associé à une grande famille atteinte de la maladie de Parkinson [Polymeropoulos et coll., 1996]. Puis l'haplotype 4p15 a été découvert et désigné comme PARK4, mais il a été confirmé plus tard que PARK1 était le même locus [Farrer et coll., 1999].

La première mutation de la protéine α -synucléine associée à une forme génétique de la maladie fut la mutation A53T [Polymeropoulos et coll., 1997]. Les sujets présentant cette mutation peuvent développer une maladie de Parkinson à un âge adulte (entre 20 et 85 ans), par des syndromes cardinaux répondant à la L-DOPA, une dysphagie, une dysarthrie et des troubles cognitifs [Xiong et coll., 2016]. Depuis, cinq autres mutations ont été découvertes chez des sujets parkinsoniens, avec une transmission autosomique dominante. La mutation A30P est associée à une maladie de Parkinson qui est diagnostiquée à un âge de 54 à 76 ans, dont le phénotype est similaire à la forme idiopathique de la maladie [Kruger et coll., 1998 et 2001]. Les sujets présentant la mutation E46K peuvent développer à l'âge de 50-65 ans une maladie de Parkinson associée à des hallucinations visuelles et une démence à corps de Lewy [Zarranz et coll., 2004]. La mutation H50Q altère la morphologie de la protéine, tout comme les mutations A53T et E46K [Appel-Cresswell et coll., 2013]. La mutation G51D est associée à l'apparition précoce (à environ 30 ans) d'une forme clinique différente de la forme idiopathique. Les patients

présentent une atrophie multisystématisée (tels que des troubles de l'autonomie, une progression rapide de la maladie) et des signes moteurs répondants à la L-DOPA [Kiely et coll., 2013 et 2015 ; Lesage et coll., 2013]. Enfin, la mutation A53E a été reportée chez une famille présentant, en plus du phénotype classique de la maladie de Parkinson, une atrophie multisystématisée atypique [Pasanen et coll., 2014]. Des multiplications dans le locus *SNCA* sont également associées à la survenue de la maladie de Parkinson, dont les triplications [Singleton et coll., 2003 ; Deng et Yuan, 2014]. Ce qui suggère que l'augmentation du taux d'expression de cette protéine semble suffisante pour déclencher le mécanisme neurodégénératif [Chartier-Harlin et coll., 2004 ; Singleton et coll., 2003]. De plus, 47 duplications du gène *SNCA* ont été reportées à ce jour chez des malades atteints de la maladie de Parkinson. Le plus souvent, un phénotype clinique atypique apparaît à un âge moyen de 48 ans avec, en plus de la triade parkinsonienne, des hallucinations visuelles, un trouble du sommeil paradoxal et des troubles dysautonomiques et cognitifs [Konno et coll., 2016]. D'autre part, des polymorphismes du gène *SNCA* sont associés aux formes sporadiques de la maladie [Simon-Sanchez et coll., 2009 ; Maraganore et coll., 2006]. Ces polymorphismes affectent davantage le taux d'expression protéique plutôt que sa fonction, et mettent en évidence son rôle central dans la majorité des cas de la maladie de Parkinson.

2.1.4 La présence d'une mutation dans le gène *GBA1*, facteur de risque fréquemment associé aux formes sporadiques de maladie de Parkinson

La présence d'un allèle muté du gène *GBA1* a été identifiée comme étant le facteur de risque le plus fréquent associé aux formes sporadiques de maladie de Parkinson. Elle serait présente chez 7% des sujets parkinsoniens et multiplierait par cinq le risque de développer une maladie de Parkinson [Sidransky et coll., 2009 ; Goker-Alpan et coll., 2004]. Le gène *GBA1*, également appelé *GBA*, code pour la protéine glucocérébrosidase lysosomale, également appelée glucocérébrosidase acide, qui catalyse l'hydrolyse des glucosylcéramides en glucose et céramides dans le lysosome [Cilia et coll., 2016]. Plus de 300 mutations ont été identifiées dans le gène *GBA1*. Parmi elles, les mutations sont classées en termes de sévérité de risque de développer la maladie de Parkinson [Gan-Or et coll., 2015]. Les mutations sévères *GBA1* ont un Odds-ratio de développer la maladie de l'ordre de 14,6 à 19,3, et concernent principalement les mutations 84GG, V394L et L444P. Ces mutations sont associées à un développement plus précoce de la maladie de Parkinson (de

l'ordre de 5 ans) par rapport aux sujets présentant une mutation modérée *GBA1*. Ces mutations modérées concernent principalement les mutations *N370Q*, *IVS2+1G>A*, *370Rec* et présentent un odds ratio de 3 à 4,7 [Gan-Or et coll., 2015].

Les mécanismes sous-tendant l'association entre les mutations *GBA1* et maladie de Parkinson pourraient mettre en jeu des changements de la conformation de la glucocérébrosidase et une altération de sa fonction enzymatique favorisant une accumulation pathologique d' α -synucléine [Sidransky et Lopez, 2012].

2.2 Les facteurs environnementaux

Les formes sporadiques seraient associées dans la majorité des cas à une interaction gène-environnement [Fleming, 2017] (figure 2). L'âge est un facteur de risque majeur. Ainsi, la prévalence chez les sujets âgés de 70 à 79 ans (1087/100 000 personnes) est dix fois plus importante que chez les âgés de 50 à 59 ans [Elbaz et coll., 2016]. Le sexe est également un facteur de risque établi puisque la maladie de Parkinson est davantage diagnostiquée chez les hommes, avec un sexe-ratio homme/femme de 1,5 [Kalia et Lang, 2015].

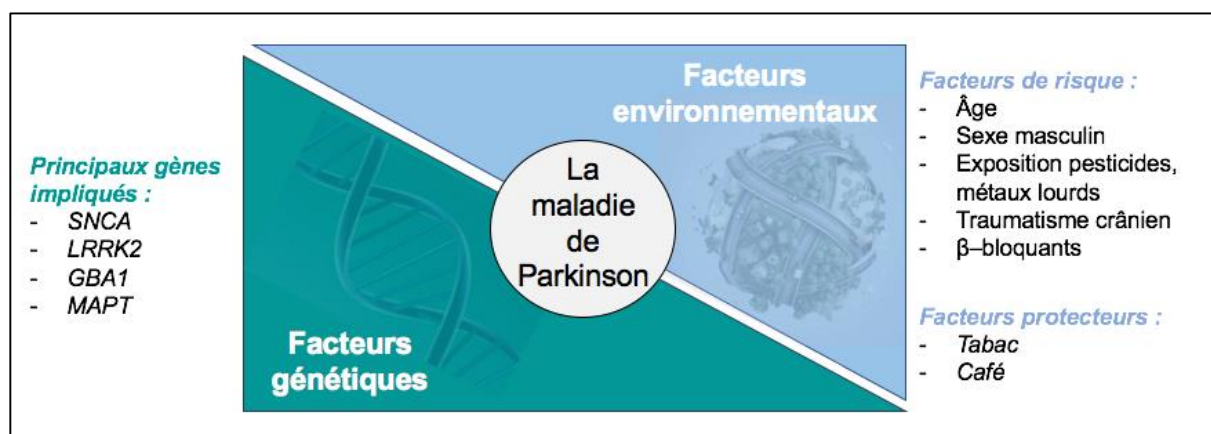


Figure 2 : Représentation schématique des facteurs impliqués dans les cas sporadiques de la maladie de Parkinson.

La méta-analyse réalisée par Noyce et collaborateurs met en avant plusieurs facteurs environnementaux tels qu'une exposition aux pesticides et aux herbicides, la vie en milieu rural, les activités agricoles, l'ingestion d'eau de pluie, la survenue de traumatisme crânien et l'usage de β -bloquant [Noyce et coll., 2012]. L'exposition aux pesticides constituerait le facteur de risque environnemental majeur de cette maladie neurodégénérative connue à ce jour. Depuis 2012, la

maladie de Parkinson est considérée en France comme une maladie professionnelle chez les sujets exposés aux pesticides pendant plus de 10 ans, par l'utilisation de différents produits tels que le paraquat, le maneb, la roténone et le MPTP [INRS, 2012]. Parmi les pesticides incriminés figurent notamment des pesticides de la famille des organochlorés, le paraquat et la roténone. L'exposition aux pesticides présente un odds ratio de 2,4 et l'exposition aux composés organochlorés semble avoir une relation effet-dose [Elbaz et coll., 2009]. Tout d'abord, les organochlorés ont une utilisation limitée en France depuis l'interdiction d'utilisation des composés les plus toxiques dans les années 1970, car ils représentent un groupe majeur de polluants organiques persistants. Très lipophiles, les composés organochlorés traversent facilement la BHE où ils s'accumulent, et où ils peuvent engendrer un stress oxydant [Banerjee et coll., 2001] et interagir avec les récepteurs GABAergiques [Pomes et coll., 1994 ; Ikeda et coll., 1998 ; Vale et coll., 2003]. Le paraquat est un herbicide dont l'utilisation en France est interdite depuis 2007. Il présente une structure et une action similaire au MPP+. Le MPP+ est le métabolite actif du MPTP (1-méthyl-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dont l'effet néfaste a été découvert en 1982 chez des sujets toxicomanes ayant consommé ce contaminant de l'héroïne et développé un syndrome parkinsonien [Langston et coll., 1983]. Le MPTP, lipophile, traverse la BHE, atteint les astrocytes et est transformé en métabolite actif, le MPP+. Via le transporteur de la dopamine, le MPP+ va être stocké dans les vésicules neuronales et va inhiber le complexe I de la chaîne mitochondriale, libérant des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et réduisant la synthèse d'ATP [Javitch et coll., 1985]. Le stockage vésiculaire provoque une libération de dopamine dans l'espace intracellulaire, transformant la dopamine en métabolite toxique, tel que la 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) [Burke et coll., 2008 ; Panneton et coll., 2010]. Outre le paraquat, il a été suggéré que le maneb puisse également agir comme le MPTP [Thiruchelvam et coll., 2000 ; Takahashi et coll., 1989 ; Kachroo et coll., 2010]. La toxicité de la roténone proviendrait quant à elle de son effet inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il s'agit d'un insecticide dont l'usage en France est interdit depuis 2011 [Hisata, 2002]. Hautement lipophile, la roténone traverse la BHE mais n'est pas reconnue comme un polluant majeur du fait de sa courte demi-vie (de 3 à 5 jours).

Une association entre l'apparition de la maladie de Parkinson et la proximité géographique des industries à métaux est également observée [Rybicki et coll.,

1993]. L'exposition au manganèse et au fer sont associées au risque de développer la maladie [Smyth et coll., 1973 ; Dexter et coll., 1987]. Le manganèse est un élément essentiel impliqué dans de multiples fonctions biologiques, présent dans certains fongicides tels que le maneb et le mancozeb [Roth et coll., 2013]. Un apport excessif, par une activité minière ou de soudure, peut engendrer le manganisme, qui est une pathologie neurodégénérative proche de la maladie de Parkinson. Cet excès de manganèse provoque divers dommages tels que des dysfonctions mitochondriales, un stress oxydant, une activation microgliale et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [Kwakye et coll., 2015]. Egalement, le fer est un facteur de risque environnemental de la maladie de Parkinson. Cet élément maintient les fonctions physiologiques cérébrales et est impliqué dans le métabolisme des neurotransmetteurs [Ward et coll., 2014]. Mais lorsque les concentrations dépassent les capacités de stockage, l'excès de fer peut stimuler la production de radicaux libres, entraîner un stress oxydatif et une mort cellulaire [Kruszewski, 2003 ; Double et coll., 2003]. Chez les malades atteints de la maladie de Parkinson, le fer ferrique est détecté en plus grande quantité dans les corps de Lewy de la substance noire [Castellani et coll., 2000 ; Gorell et coll., 1995].

3. Mécanismes physiopathologiques de la maladie

3.1 Les lésions de la maladie de Parkinson

3.1.1 La neurodégénérescence dopaminergique

Les troubles moteurs caractéristiques de la maladie seraient associés à une perte de plus de 50% des neurones dopaminergiques, qui synthétisent la dopamine à partir de la tyrosine et de la tyrosine hydroxylase [Fearnley et Lees, 1991 ; Kannarkart et coll., 2013 ; Jackson et coll., 1994]. Cette dégénérescence dopaminergique atteint la voie nigro-striée, constituée de neurones situés dans la substance noire qui se projettent vers le striatum, une zone cérébrale impliquée dans le contrôle des mouvements. Le dérèglement de cette voie est donc responsable des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson, et plus particulièrement l'akinésie, qui résulte d'une incapacité à exécuter les mouvements volontaires. La cascade d'évènements moléculaires menant à la destruction progressive de ces neurones dopaminergiques n'est pas clairement définie à ce jour. Cette neurodégénérescence

pourrait provenir de différents troubles cellulaires liés aux différents mécanismes physiopathologiques développés dans ce paragraphe [Michel et coll., 2016].

3.1.2 Les corps de Lewy et l' α -synucléine

Les corps de Lewy sont des lésions intracellulaires retrouvées dans environ 4% des neurones de la substance noire des sujets parkinsoniens, qui seraient probablement dégradés lors de la mort neuronale [Spillantini et coll., 2018]. Les corps de Lewy sont constitués principalement d' α -synucléine sous forme agrégée, ubiquitinyllée et ayant subi des modifications post-traductionnelles dont une phosphorylation du résidu de sérine en position 129 (α SYN P129S) [Spillantini et coll., 1997 ; Fujiwara et coll., 2002 ; Lees et coll., 2009]. Ils sont également abondants dans d'autres syndromes parkinsoniens tels que la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée (AMS), qui sont des maladies regroupées sous le terme de synucléinopathies [Spillantini et coll., 1998a et 1998b ; Wakabayashi et coll., 1998 ; Tu et coll., 1998]. Bien que ce soit une lésion caractéristique de la maladie, ces corps de Lewy sont également observés chez 10% des sujets asymptomatiques de plus de 60 ans [Forno et coll., 1969 ; Gibb et coll., 1988].

L' α -synucléine est une petite protéine ubiquitaire de 140 acides aminés, synthétisée à partir du gène *SNCA* dont la séquence est hautement conservée entre les espèces. A titre d'exemple, le gène *SNCA* localisé sur le chromosome 4 chez l'Homme et sur le chromosome 6 chez la souris présentent 95% d'homologie [Clayton et George, 1998 ; George, 2002, Chen et coll., 1995 ; Touchman et coll., 2001]. L' α -synucléine est une protéine majoritairement neuronale localisée dans le compartiment cytoplasmique des terminaisons nerveuses présynaptiques [Weinreb et coll., 1996 ; Kahle et coll., 2000]. Au niveau périphérique, celle-ci est présente dans les cellules hématopoïétiques, les plaquettes, les oligodendrocytes, les muscles squelettiques et le cœur [Norris et coll., 2004]. Son rôle n'est pas totalement défini à ce jour. Physiologiquement dépliée, l' α -synucléine peut adopter une conformation différente en fonction de l'environnement physico-chimique, ce qui lui permet d'interagir notamment avec de nombreux cofacteurs tels que les phospholipides acides membranaires [Davidson et coll., 1998 ; Kim et coll., 2006]. Son association à la bicouche lipidique permettrait de moduler les trafics vésiculaires au niveau du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi et des synapses [Clayton et George, 1999 ; Fortin et coll., 2005 ; Thayanidhi et coll., 2010]. Elle pourrait agir sur la quantité cérébrale en dopamine par différents mécanismes. D'une part, elle

participe à la régulation de la synthèse de la dopamine directement en inhibant la tyrosine hydroxylase, et indirectement en activant la phosphatase PP2A qui à son tour déphosphoryle et inhibe la tyrosine hydroxylase [Perez et coll., 2002 ; Lou et coll., 2010]. D'autre part, l' α -synucléine atténue l'activité du transporteur de la dopamine, ce qui diminue la recapture de la dopamine dans l'espace synaptique [Wersinger et Sidhu, 2003]. Enfin, l'accumulation d' α -synucléine peut être neurotoxique, car elle est associée à une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire, responsable d'un stress oxydant et d'une altération de la synthèse de l'ATP [Devi et coll., 2008].

Différentes modifications post-traductionnelles peuvent être responsables de formes toxiques de l' α -synucléine. Cette protéine phosphorylée sur le résidu de sérine 87 est observée en quantité importante dans la maladie d'Alzheimer et dans l'AMS. Elle pourrait être responsable d'une diminution de la formation des fibrilles et de sa liaison membranaire [Paleologou et coll., 2010]. D'autre part, l' α -synucléine peut être phosphorylée sur un résidu tyrosine (positionnée en 39, 125, 133 et 136) mais leur impact a été peu étudiée [Negro et coll., 2002]. Enfin, la phosphorylation en serine 129 est la plus connue car c'est la forme d' α -synucléine prépondérante dans les corps de Lewy, suggérant que la détection de cette modification post-traductionnelle pourrait être un critère robuste d'une synucléinopathie. Son impact sur la pathogénèse est controversé et est peu connu de nos jours, mais elle pourrait favoriser l'oligomérisation de l' α -synucléine [Walker et coll., 2013 ; Fujiwara et coll., 2002].

Plusieurs hypothèses suggèrent que l' α -synucléine pourrait être pathologique par sa transformation en feuillet β , responsable de la dimérisation et de l'oligomérisation de la protéine [Uversky, 2007]. Ces formes oligomériques perturberaient la perméabilité en créant des pores dans la bicouche lipidique membranaire [Lashuel et coll., 2002 ; Waxman et Giasson 2009], provoquant un trouble de l'exocytose, une libération de dopamine [Larsen et coll., 2006 ; Scott et coll., 2010], et un blocage du trafic vésiculaire du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi [Gosavi et coll., 2002 ; Cooper et coll., 2006 ; Thayanidhi et coll., 2010]. Ces formes oligomériques s'assemblent et forment des fibrilles insolubles dans les détergents qui sont résistantes aux enzymes protéolytiques tels que la protéinase K. Ces fibrilles sont observées dans les cerveaux de patients atteints de synucléinopathies [Miake et coll., 2002 ; Neumann et coll., 2004].

L'équipe de Braak suggère que l'accumulation de l' α -synucléine serait progressive, séquentielle et prédictive, de la forme pré-clinique à la forme symptomatique de la maladie [Braak et coll., 2003] (figure 3). L'accumulation serait arbitrairement divisée en 6 étapes. L'accumulation pathologique de l' α -synucléine démarrerait dans le plexus gastrique de Meissner et les nerfs olfactifs, puis diffuserait vers le tronc cérébral et la partie compacte de la substance noire. La pathologie corticale, restreinte au mésocortex temporal, s'étendrait dans le neocortex puis les aires neocorticales associées aux ordres sensoriels et prémoteurs. Dans cette hypothèse, les stades 1 et 2 peuvent correspondre à l'apparition des symptômes pré-moteurs, le stade 3 aux troubles moteurs associés à la neurodégénérescence dopaminergique, et les stades 4 à 6 aux troubles non moteurs associés au stade avancé de la maladie. Différents groupes de recherche ont confirmé ce système de diffusion, même si au moins 15% des patients atteints de la maladie de Parkinson ne sont pas conformes à ce schéma [Kalaitzakis et coll., 2008 ; Parkkinen et coll., 2008].

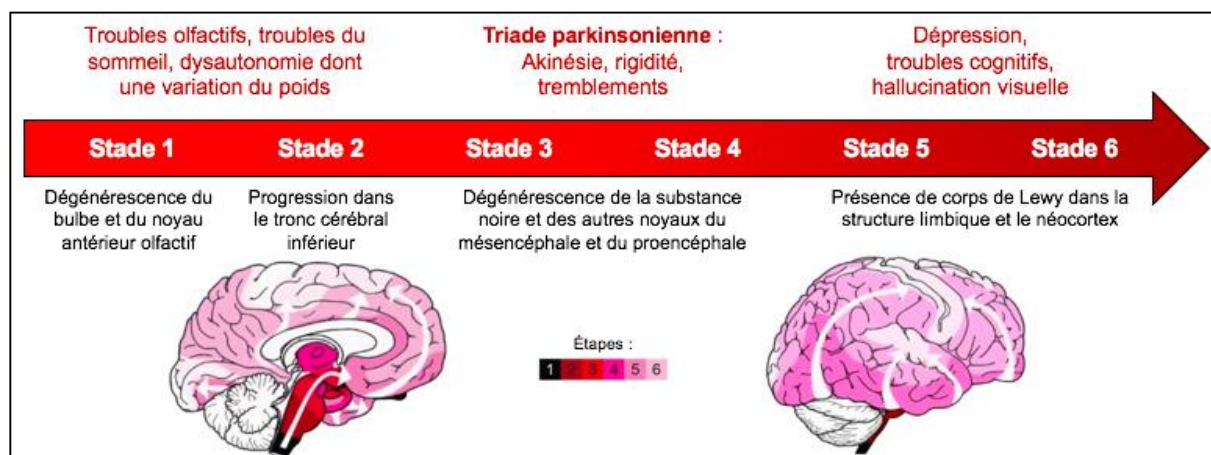


Figure 3 : Représentation du processus pathologique de la maladie de Parkinson. d'après l'hypothèse de Braak [Braak et coll., 2003].

L'initiation de cas sporadiques de la maladie de Parkinson pourrait être causée par un pathogène viral ou bactérien, se propageant dans le système nerveux central par deux schémas potentiels. D'une part ce pathogène pourrait être inhalé, atteindre le bulbe olfactif puis le lobe temporal par voie antérograde. D'autre part, son ingestion pourrait engendrer une accumulation dans le système nerveux entérique puis dans le système nerveux central [Hawkes, Del Tredici et Braak, 2009]. L'exposition à ce pathogène ou à une toxine environnementale pourrait provoquer une inflammation locale et/ou un stress oxydant intestinal responsable d'une aggrégation d'alpha-

synucléine qui ensuite se propagerait dans le système nerveux central et dans la substance noire [Rietdijk et coll., 2017].

L' α -synucléine aurait la capacité de se propager d'un neurone vers un neurone voisin selon le phénomène « prion-like », gagnant ainsi tout le tissu cérébral. En effet, une accumulation d' α -synucléine temps-dépendante a été observée dans des neurones humains fœtaux mésencéphaliques greffés dans le striatum de sujets parkinsoniens à un stade avancé de la maladie [Li et coll., 2008 ; Kordower et coll., 2008]. Ce phénomène pourrait être la base neurobiologique de cette diffusion stéréotypique, où des inclusions d' α -synucléine diffuseraient vers d'autres régions cérébrales [Goedert, 2015 ; Shimozawa et coll., 2017]. Pour confirmer cette hypothèse, différents modèles animaux accumulant l' α -synucléine ou mimant le transfert de cette protéine ont été développés et seront présentés dans un prochain chapitre.

3.1.3 La neuroinflammation

La neuroinflammation chronique serait un facteur pathogénique majeur et précoce de la maladie de Parkinson. Ainsi, une activation microgliale est observée en imagerie cérébrale dans la substance noire des patients dès les phases précoces de la maladie. Celle-ci augmente avec la sévérité des troubles moteurs [Gerhard et coll., 2006 ; Ouchi et coll., 2005 et 2009] et est associée à la perte massive des neurones dopaminergiques dans la substance noire des patients aux stades plus avancés de la maladie [Kannakart et coll., 2013]. De plus, une gliose réactionnelle des astrocytes activés apparaît au sein des zones neurodégénérées dans la maladie de Parkinson [Kannakart et coll., 2013]. Il est important de prendre en compte que cette mort neuronale peut également induire une neuroinflammation par relargage de facteurs cellulaires apoptotiques et nécrotiques [Wilms et coll., 2009 ; Marín-Teva et coll., 2011].

Le mécanisme inflammatoire, notamment la sécrétion de cytokines et d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), pourrait contribuer au développement de cette maladie et à la neurodégénérescence dopaminergique [Tansey et Goldberg., 2010]. Plusieurs études *in vitro* démontrent que les neurones dopaminergiques sont très sensibles à la toxicité induite par ces cytokines pro-inflammatoires [McGuire et coll., 2001 ; Mount et coll., 2007]. Des élévations des taux de plusieurs cytokines pro-inflammatoires au niveau central (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 et IFN γ), et périphérique (TNF α et IL-6) sont observées chez les patients parkinsoniens [Dobbs et coll., 1999 ; Mogi et coll., 1994 ; Mount et coll., 2007 ; Blum-Degen et coll., 1995].

L'augmentation de la concentration sanguine en IL-6 est corrélée à un risque plus important de développer la maladie de Parkinson [Chen et coll., 2008], et les taux sanguins en TNF α et IL-6 sont corrélés avec la sévérité des troubles moteurs de la maladie [Koziorowski et coll., 2012].

D'autre part, un lien entre l'activation microgliale et l'infiltration des lymphocytes T est observé chez ces malades [McGeer et coll., 1988a et 1988b]. Le CMH I, qui active les lymphocytes T CD8+, est augmenté dans le striatum des patients parkinsoniens [Mogi et coll., 1995] et peut engendrer une cytolysse par libération de cytokines pro-inflammatoires. Au niveau périphérique, les lymphocytes T et B sont moins nombreux et présentent diverses altérations tels qu'un noyau plus grand, des coupures de l'ADN et une oxydation des bases puriques. Ces anomalies sont améliorées sous traitement par L-DOPA [Cornetta et coll., 2009 ; Bas et coll., 2001 ; Stevens et coll., 2012]. De plus, le ratio CD4+/CD8+ diminue avec une augmentation de la synthèse de l'IFN γ par les lymphocytes T [Baba et coll., 2005].

Parmi les autres classes lymphocytaires majeures, le lymphocyte B est un médiateur de l'immunité humorale qui sécrète des immunoglobulines ou des anticorps [Shlomchik et Weisel, 2012]. Ces anticorps dirigés contre des protéines cérébrales sont présents dans le sérum des sujets parkinsoniens [Han et coll., 2012] malgré une diminution du nombre de lymphocytes B sanguins et une absence d'infiltration de ces lymphocytes [Brochard et coll., 2009 ; McGeer et coll., 1988a et 1988b ; Bas et coll., 2001, Stevens et coll., 2012].

Cependant, même si l'ibuprofène semble avoir un léger effet protecteur, le traitement par anti-inflammatoire non stéroïdien ne modifierait pas le risque de développer la maladie de Parkinson [Samii et coll., 2009]. Chez les consommateurs chroniques de cette classe médicamenteuse, l'inhibition de l'activation microgliale et de la synthèse de médiateurs pourrait contribuer à la diminution de l'incidence des cas de Parkinson [Chen et coll., 2003 et 2005]. Ces résultats suggèrent donc que les traitements à visée anti-inflammatoire pourraient être une cible thérapeutique afin de limiter la progression de la maladie de Parkinson [Tansey et Goldberg, 2010].

3.2 *Les autres facteurs pouvant intervenir dans la physiopathologie*

3.2.1 *Le stress du réticulum endoplasmique*

Le réticulum endoplasmique (RE) est le lieu de synthèse de protéines sécrétées à l'extérieur de la cellule, mais aussi de protéines et de lipides constituant

les membranes des organites cellulaires tels que l'appareil de Golgi, les lysosomes et les mitochondries. C'est un lieu de maturation des protéines, où elles sont repliées et assemblées en complexes multi-protéiques. Cependant, si certaines conformations sont anormales, les protéines sont retenues dans le RE et sont soit dégradées, soit prises en charge par des protéines chaperones pour leur permettre d'acquérir une conformation correcte. L'accumulation de protéines mal conformées entraîne un stress du RE, qui est un phénomène physiologique d'adaptation. Cet effet induit une réponse protectrice en restaurant l'homéostasie et la fonction cellulaire [Hetz, 2012]. Cependant, un stress chronique du RE peut engendrer une apoptose et une mort cellulaire.

Dans la maladie de Parkinson, l'accumulation d' α -synucléine dans les tissus cérébraux pourrait être une source de stress chronique délétère du RE, jouant un rôle central dans la mort neuronale [Colla et coll., 2012].

3.2.2 L'altération de la voie autophagie-lysosome

L'autophagie est un processus d'autodestruction physiologique. Les métabolites issus de cette dégradation sont transportés afin d'être recyclés sous forme de nouvelles macromolécules, ou afin d'être utilisés sous forme d'énergie [Boya et coll., 2013]. Trois formes d'autophagie existent. Tout d'abord, la micro-autophagie implique une invagination directe de la membrane lysosomale de constituants cellulaires. Secondairement, l'autophagie médiée par des protéines chaperones permet d'éliminer les complexes formés par ces protéines, qui sont amenés sélectivement dans la lumière lysosomale à l'aide d'un récepteur membranaire spécifique. Enfin, la macro-autophagie est la forme la moins sélective d'autophagie, où les autophagosomes séquestrent le matériel cytosolique (agrégats, organelles défectueux, lipides) de façon non sélectif avant de le libérer dans les lysosomes pour dégradation.

Dans la substance noire des patients parkinsoniens, l'augmentation du nombre d'autophagosomes et la diminution du nombre de protéines lysosomales suggèrent une perturbation du flux autophagique chez ces patients [Anglade et coll., 1997]. De plus, l'autophagie par protéine chaperone (qui est le mécanisme majoritaire de la dégradation de l' α -synucléine) est également altérée [Cuervo et wong 2014[; Cuervo et coll., 2004]. Cette réduction d'activité autophagique peut entraîner une accumulation de protéines mal conformées, notamment l'accumulation d' α -

synucléine, et accélérer la progression des maladies neurodégénératives [Fujikake et coll., 2018].

3.2.3 Le stress oxydant

Les espèces réactives à l'oxygène ou *reactive oxygen species* (ROS) sont une catégorie importante de radicaux libres cellulaires. En effet, un équilibre entre les espèces pro et anti-oxydantes est nécessaire. Cependant, lorsque le taux de radicaux libres augmente, la capacité de défense anti-oxydante peut être atteinte et engendrer un stress oxydant ainsi que des dommages sévères irréversibles sur les composants cellulaires tels que l'ADN, les protéines et les lipides [Tramutola et coll., 2016]. Le cerveau possède une large capacité oxydative mais une faible habileté à compenser le stress oxydant par sa consommation importante en oxygène, sa composition lipidique, et sa faible quantité en enzymes anti-oxydantes [Calabrese et coll., 2009].

La source de ROS peut provenir d'une dysfonction mitochondriale mais aussi de la production par la NADPH-oxydase, qui est la source majeure de ROS dans la microglie. Les patients parkinsoniens présentent un stress oxydant dans la partie compacte de la substance noire associé à une activation microgliale et un taux de ROS plus important [Qureshi et coll., 1995 ; Hunot et coll., 1996]. L'augmentation de l'expression de la sous-unité membranaire gp91 (ou NOX2) de la NADPH-oxydase dans la substance noire de sujets parkinsoniens suggèrent que des inhibiteurs de la NADPH oxydase peuvent être une cible thérapeutique potentielle dans la maladie de Parkinson [Belarbi et coll., 2017].

3.2.4 Le dérèglement de la fonction mitochondriale

La mitochondrie est un organite intracellulaire ayant pour rôle de fournir l'énergie nécessaire aux cellules et de participer à l'apoptose [Tait et Green, 2013]. Dans la maladie de Parkinson, différentes anomalies de la fonction mitochondriale sont observées tels que des troubles de la réparation et de l'élimination des organelles endommagées ou défectueux, et un trouble de la synthèse de l'ADN mitochondrial et nucléaire codé par les protéines mitochondriales. Ces anomalies pourraient être provoquées par une interaction directe entre les oligomères d'alpha-synucléine et les membranes mitochondriales, qui pourraient entraîner leur fragmentation [Nakamura et coll., 2011]. Dans ce cas, ces anomalies de la fonction mitochondriale peuvent bloquer la signalisation de mTOR, qui est un régulateur

majeur du métabolisme cellulaire et de l'homéostasie énergétique [Laplante et coll., 2009]. De plus, un déficit de l'activité du complexe I mitochondrial, nécessaire à la production d'énergie, a été observé dans le cerveau de patients parkinsoniens provoquant un stress oxydant et une diminution de la production énergétique [Schapira et coll., 1990].

3.2.5 Troubles de l'homéostasie calcique

Dans la substance noire, les neurones dopaminergiques ont une activité basale dépendante des canaux calciques voltage-dépendants [Nedergaard et coll., 1993 ; Shepard et Stump, 1999]. Ces neurones dopaminergiques possèdent une faible capacité de stockage en calcium et peuvent être fragilisés en cas de trouble de l'homéostasie calcique [Surmeier et Schumacker, 2013].

Des études *in vivo* démontrent que la présence de corps de Lewy dans ces neurones dopaminergiques peut provoquer un influx calcique important et entraîner un stress oxydant mitochondrial [Dryanovski et coll., 2013]. Ce stress réduit les capacités des réserves énergétiques et pourrait rendre ces neurones dopaminergiques vulnérables [Rivero-Rios et coll., 2014]. De plus, l'augmentation de cette concentration calcique active la tyrosine hydroxylase et la synthèse de dopamine ce qui peut causer une auto-oxydation du neurotransmetteur [Rittenhouse et Zigmond 1999 ; Michel et Hefti 1990].

4. Prise en charge thérapeutique

4.1 Les traitements symptomatiques actuels en France

A ce jour, les traitements antiparkinsoniens disponibles sont symptomatiques et permettent d'améliorer la qualité de vie des patients. Ainsi ces thérapeutiques diminuent les troubles moteurs de la maladie en palliant le déficit dopaminergique au niveau cérébral. La dopamine ne franchit pas la BHE et ne peut donc être utilisée en l'état à des fins thérapeutiques. Ainsi différents traitements antiparkinsoniens, qui traversent la BHE, ont été développés (figure 4). Ces traitements sont prescrits en prenant compte des signes cliniques, de l'évolution de la maladie et de la tolérance aux traitements [Recommandations HAS, 2012 ; Defebvre et Moreau, 2017].

Le précurseur de la dopamine, la L-DOPA, est le traitement antiparkinsonien le plus efficace sur les troubles moteurs. Cependant, après 10 années de traitement, 80% des patients présentent des effets indésirables moteurs invalidants, à type de dyskinésies et d'effet on-off [Gérard, 2008]. Ces complications motrices sont liées à la pulsatilité de la stimulation des récepteurs dopaminergiques altérés, qui ne gèrent plus le stockage en dopamine. D'autre part, les agonistes dopaminergiques stimulent les récepteurs dopaminergiques D2 post-synaptiques, qui sont les principaux récepteurs au niveau striatal. Ils sont utilisés chez le sujet parkinsonien jeune, car les effets indésirables psycho-comportementaux sont fréquents et peuvent limiter leur utilisation [Voon et coll., 2007 ; Antonini et coll., 2009]. Seul ou associé à la L-DOPA, les inhibiteurs de la monoamine oxydase de type B (IMAO-B) inhibent irréversiblement la monoamine oxydase de type B et permettent d'augmenter la biodisponibilité de la dopamine cérébrale, tout comme les inhibiteurs de la catéchol-O-méthyltransférase (ICOMT).

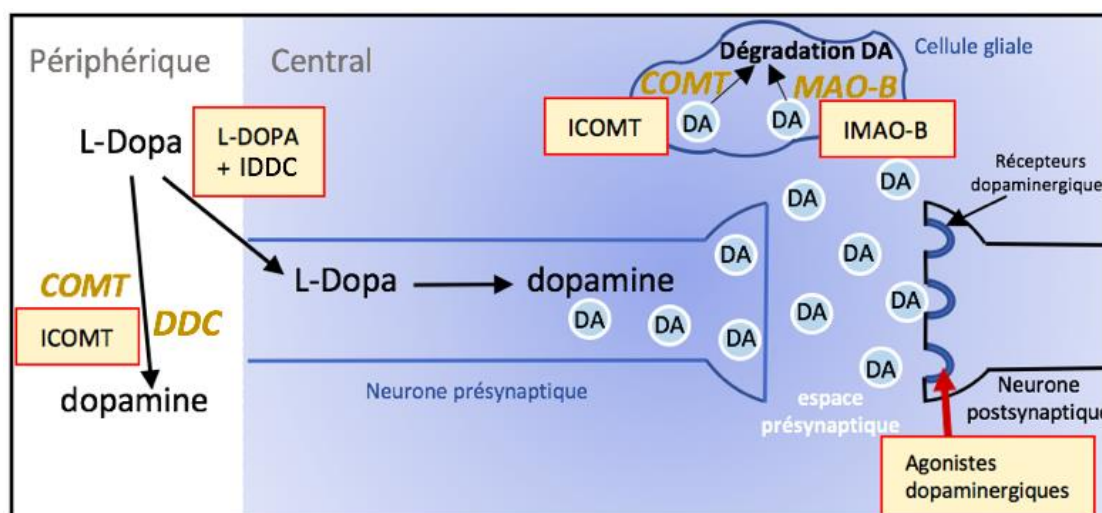


Figure 4 : Représentation du mode d'action des principales classes d'antiparkinsoniens. Ils agissent en mimant une activité dopaminergique (agonistes dopaminergiques, L-DOPA) ou en limitant la dégradation de la dopamine (IDDC, ICOMT, IMAO-B). IDDC = *inhibiteur de la dopa-décarboxylase* ; ICOMT = *inhibiteur de la catéchol-O-méthyl transférase* ; IMAO-B = *inhibiteur de la monoamine oxydase de type B* ; DA = *dopamine*.

Puis, lorsque des fluctuations motrices importantes perdurent malgré l'association de thérapies présentées précédemment, des traitements dopaminergiques continus peuvent être envisagés [Van Wamelen et coll., 2018 ; Muthuraman et coll., 2018]. Ce sont des techniques invasives permettant une amélioration des symptômes moteurs, une réduction du nombre de traitement *per os* et une amélioration de la qualité de vie des patients. Tout d'abord, la pompe à

apomorphine par voie sous-cutanée permet un apport continu d'apomorphine qui stabilise les concentrations et les effets de l'agoniste dopaminergique. Néanmoins, des complications peuvent survenir telles qu'une intolérance psycho-comportementale et des nodules sous-cutanés [Titova et Chaudhuri, 2016]. Puis, la stimulation cérébrale profonde peut être utilisée chez les jeunes patients atteints de complications motrices. Par repérage électrophysiologique de la cible, une stimulation bilatérale à haute fréquence est le plus souvent réalisée et permet de synchroniser une population neuronale [Jia et coll., 2008]. Cependant, de nombreux critères doivent être requis pour cette prise en charge tels qu'un âge jeune (moins de 70 ans), une dopasensibilité de plus de 50%, une absence de démence, de troubles psychocomportementaux, et d'autres pathologies évolutives. Enfin, un gel de L-DOPA peut être administré en perfusion continue par voie entérale. Cette thérapie permet de limiter les périodes off et les dyskinésies en court-circuitant la vidange gastrique fluctuante [Olanow et coll., 2014]. Les psychoses et les pathologies empêchant le geste chirurgical (troubles sévères de l'hémostase, péritonite, pancréatite aiguë, anomalie de la paroi gastrique) contre-indiquent l'utilisation de cette thérapeutique.

Ainsi, bien que de multiples thérapeutiques existent, elles sont toutes symptomatiques et ne permettent pas la guérison. Le développement de traitements à visée curative serait une avancée majeure dans la prise en charge de la maladie.

4.2 *Modélisation de la maladie de Parkinson et pistes thérapeutiques*

4.2.1 *Les modèles in vivo de la maladie de Parkinson*

L'identification de facteurs de risques associés à la maladie de Parkinson a permis la mise en place de modèles expérimentaux pour explorer les mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués dans cette maladie. Ces modèles présentent certaines caractéristiques physiopathologiques et comportementales de la maladie de Parkinson. Certains modèles présentent une accumulation progressive d'inclusions d' α -synucléine, qui peuvent permettre de mieux comprendre le mécanisme de propagation de cette protéine. Dans ce chapitre sont traités les modèles animaux dits « environnementaux » (obtenus par exemple par injection de substances neurotoxiques ou par administration de pesticides) et les modèles dits « génétiques » (basés par exemple sur la surexpression de gènes associés à des formes familiales de maladie de Parkinson).

4.2.1.1 Les modèles environnementaux

Les modèles basés sur l'utilisation de neurotoxiques

Le modèle 6-hydroxydopamine (6-OHDA) est le plus ancien modèle utilisé [Ungerstedt, 1968]. Ce composé peut être impliqué dans le processus neurodégénératif des patients atteints de la maladie de Parkinson. En effet, cette forme hydroxylée, produite lors d'un excès de dopamine, peut inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et induire des radicaux libres neurotoxiques [Betarbet et coll., 2002]. Le composé ne traversant pas la BHE, une injection stéréotaxique est réalisée au niveau de la substance noire ou du striatum [Perese et coll., 1989 ; Przedborski et coll., 1995]. L'injection unilatérale permet à chaque animal d'être son contrôle, par l'hémisphère cérébral non traitée par la toxine [Ungerstedt et coll., 1968]. L'ampleur de la lésion dépend de la quantité de 6-OHDA injectée, du site d'injection et de l'espèce animale utilisée. Une perte de neurones dopaminergiques et de dopamine est observée dans ce modèle, ainsi que des troubles moteurs sévères et brutaux [Betarbet et coll., 2002]. Cependant, ce modèle ne présente pas de troubles non moteurs, d'aggrégats protéiques et de corps de Lewy [Blandini et coll., 2008].

Le modèle MPTP est le modèle de syndrome parkinsonien *in vivo* le plus utilisé. Ce composé lipophile traverse la BHE pour être transformé en MPP⁺ par les IMAO-B. Celui-ci inhibe également le complexe I de la chaîne mitochondriale [Javitch et coll., 1985] et provoque une libération de dopamine dans l'espace intracellulaire, transformant la dopamine en 6-OHDA [Burke et coll., 2008 ; Panneton et coll., 2010]. Ce composé, administré par différentes voies d'administration (orale et injectable), est utilisé principalement chez les souris et les primates non humains [Zigmond et coll., 1989 ; Przedborski et coll., 1995]. L'injection systémique provoque un syndrome parkinsonien bilatéral [Langston et coll., 1984]. Ce modèle de référence réplique différents signes de la maladie tels qu'un stress oxydant, une production de ROS, des troubles énergétiques et une inflammation. Néanmoins, les inclusions d' α -synucléine ne sont pas développées dans ce modèle [Schober et coll., 2004 ; Halliday et coll., 2009]. Différents schémas de posologie sont décrits : une administration de doses élevées de MPTP pendant une courte durée permet d'obtenir un modèle de syndrome parkinsonien aigu, alors que l'injection de petites doses pendant une longue période permet d'obtenir un modèle ressemblant davantage à la pathologie humaine [Iravani et coll., 2005]. Le singe MPTP répond aux traitements antiparkinsoniens et est utilisé en phase préclinique [Bezard et

Przedborski, 2011]. Ce modèle permet également d'étudier les troubles non moteurs de la maladie, notamment les troubles du sommeil paradoxal [Pessiglione et coll., 2004 ; Anderson et coll., 2007 ; Vezoli et coll., 2011]. La souris MPTP est utilisée pour étudier le processus de mort neuronale dopaminergique, le mécanisme physiopathologique et pour rechercher des traitements potentiels de la maladie de Parkinson.

Les modèles par administration de pesticides

Le paraquat est un herbicide présentant une structure et une action similaire au MPP+ [Day et coll., 1999 ; Przedborski et Ischiropoulos, 2005]. Suite à une injection par voie intra-péritonéale (IP), les souris présentent une neurodégénérescence dopaminergique, une agrégation d' α -synucléine dans la partie compacte de la substance noire [Brooks et coll., 1999 ; McCormack et coll., 2002 ; Manning-Bog et coll., 2002].

Le maneb est un fongicide diminuant l'activité locomotrice qui pourrait agir comme le MPTP et le paraquat [Thiruchelvam et coll., 2000 ; Takakashi et coll., 1989 ; Kachroo et coll., 2010]. L'effet synergique obtenu lors de la co-administration du maneb et du paraquat a entraîné l'apparition de modèles murins traités par ces deux composés pour mieux comprendre l'effet de l'exposition environnementale à plusieurs pesticides dans le développement de la maladie de Parkinson [Thiruchelvam et coll., 2003].

D'autre part, une ingestion chronique de roténone à faible dose induit une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, un stress oxydant et une diminution de la synthèse d'ATP. L'administration de cet herbicide *per os* cause des troubles moteurs, une dégénérescence nigro-striée avec une diminution du taux striatal de dopamine et une agrégation d' α -synucléine dans différentes régions cérébrales [Inden et coll., 2007 ; Pan-Montojo et Fonk, 2010]. De façon intéressante, l'accumulation de l' α -synucléine est progressive : initialement retrouvée dans le système nerveux entérique, la protéine est retrouvée dans la moelle épinière, dans le tronc cérébral puis dans la substance noire [Pan-Montojo et coll., 2010 ; Angot et coll., 2010]. L'injection intrapéritonéale de roténone provoque un phénotype sévère où les troubles comportementaux et neurobiochimiques sont réversés par la L-DOPA [Alam et coll., 2004]. L'administration intraveineuse induit une neurodégénérescence dopaminergique nigrostriatale associée à une agrégation d' α -synucléine, la présence

de corps de lewy, un stress oxydant et des problèmes gastro-intestinaux [Cannon et coll., 2009].

4.2.1.2 Les modèles génétiques

Les modèles génétiques ont été développés à partir des mutations ou de la surexpression de gènes impliquées dans la survenue de la maladie de Parkinson. Une meilleure compréhension de ces modèles permettrait de mieux comprendre le mécanisme physiopathologique de la maladie. La présentation ci-contre s'est limitée aux principaux modèles murins.

Modèles impliquant l' α -synucléine

Au vu des arguments génétiques et histopathologiques soulignant le rôle de l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson, de nombreux modèles ont été développés pour explorer le rôle de l' α -synucléine.

Parmi ces modèles, plusieurs sont basés sur la surexpression d' α -synucléine murine ou humaine comportant ou non des mutations, associés aux formes familiales de la maladie de Parkinson. L'utilisation de modèles murins surexprimant l' α -synucléine native permet d'étudier le mécanisme physiopathologique lié à une accumulation d' α -synucléine, qui est une caractéristique clé dans cette maladie neurodégénérative.

La surexpression par un promoteur permet de contrôler l'expression génique de la protéine. Le modèle murin surexprimant l' α -synucléine native sous le promoteur PrP n'est pas utilisé, car, malgré l'expression cérébrale d' α -synucléine et des troubles moteurs caractéristiques répondant à la L-DOPA, ce modèle ne présente pas d' α -synucléine sous forme fibrillaire et de neurodégénérescence dopaminergique typique [Chesselet, 2008 ; Dawson et coll., 2010]. Etant donné que la dégénérescence nigro-striée est un élément clé dans la maladie de Parkinson, le promoteur TH est utilisé afin d'obtenir une expression protéique au niveau des neurones catécholaminergiques. Ce promoteur a permis de développer des modèles murins surexprimant l' α -synucléine sous forme tronquée [Tofaris et coll., 2006 ; Wakamatsu et coll., 2008] et doublement mutée. Alors que cette protéine est sélectivement exprimée dans les neurones catécholaminergiques, l'expression de la tyrosine hydroxylase est diminuée sans évidence d'une mort neuronale [Blandini et Armentero, 2012]. D'autres promoteurs sont utilisés tels que les promoteurs PDGF β et Thy1, qui confèrent une vaste expression neuronale de l' α -synucléine

[Rockenstein et coll., 2002]. Le modèle exprimant l' α -synucléine sous le promoteur humain du gène *PGDF* codant le facteur de croissance dérivé des plaquettes β présente des anomalies sensorimotrices progressives et un déficit dopaminergique striatal. Ce modèle permet de mieux comprendre le mécanisme physiopathologique de la maladie et de tester l'effet neuroprotecteur de différentes thérapeutiques [Chesselet, 2008]. Sous le promoteur PDGF β , le modèle TgD9 exprime précocément l' α -synucléine dès l'âge de 2 mois [Masliah et coll., 2000]. La typographie de ces inclusions cérébrales suggère que ce modèle est plus proche de la démence à corps de Lewy, où l' α -synucléine s'accumule de façon importante dans le cortex. De plus, malgré la présence de troubles moteurs, cette accumulation d' α -synucléine est associée à une diminution de l'activité neuronale de la tyrosine hydroxylase, sans neurodégénérescence dans la substance noire. D'autre part, la lignée Thy1 (*Thymocyte antigen 1*) permet une expression pan-neuronale de l' α -synucléine dans les neurones corticaux et sous-corticaux, notamment dans la partie compacte de la substance noire [Rockenstein et coll., 2002]. Des inclusions d' α -synucléine protéinase K résistants sont également retrouvées dans d'autres régions cérébrales telles que les bulbes olfactifs, la substance noire, et le locus coeruleus [Neumann et coll., 2004 ; Freichel et coll., 2007 ; Ferganut et coll., 2007]. Ces souris transgéniques surexpriment l' α -synucléine à un niveau d'expression comparable à celui observé dans le cerveau de patients présentant une triplication du gène *SNCA* [Chesselet et coll., 2012]. Elles reproduisent des caractéristiques biochimiques et histopathologiques de la maladie de Parkinson telles que la formation progressive d'inclusions intraneuronales immunoréactives pour l' α -synucléine, une activation microgliale dans la substance noire dès 5 mois [Watson et coll., 2012] et des lésions cellulaires liées au stress oxydant dans la substance noire et l'hippocampe [Ferganut et coll., 2007 ; Rockenstein et coll., 2002]. A 14 mois, ces souris présentent une perte de dopamine striatale, entraînant des troubles moteurs importants répondant à la L-DOPA [Fleming et coll., 2006].

A l'inverse du modèle A30P, le modèle murin A53T présente un phénotype moteur sévère pouvant entraîner une paralysie et une mort [Giasson et coll., 2002]. Ces modèles engendrent des inclusions similaires aux corps de Lewy [Masliah et coll., 2000] et des troubles non moteurs tels que des troubles olfactifs et digestifs. Ainsi leurs utilisations permettent de tester des thérapeutiques sur les symptômes non moteurs de la maladie et de mieux comprendre le rôle de l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson [Blesa et coll., 2012].

D'autre part, des modèles présentant des fibrilles d' α -synucléine ont été développées, car celles-ci sont observées dans les corps de Lewy des sujets atteints de la maladie de Parkinson. Notamment, l'injection de cette forme fibrillaire dans différentes zones cérébrales (dont le striatum et le cortex) a permis d'étudier l'impact de cette conformation sur la perte de neurones dopaminergiques et les troubles moteurs développés dans ces modèles [Luk et coll., 2012].

Enfin, l'utilisation de vecteurs viraux représente un choix important de modèles, car cette approche permet une surexpression localisée de l' α -synucléine [Kirik et coll., 2003]. Cette surexpression peut être associée à une perte de dopamine striatale et à des troubles comportementaux [Volpicelli-Daley et coll., 2016]. Différents vecteurs viraux peuvent être employés : les lentivirus et les adénovirus [Kirik et coll., 2002 ; Lo Bianco et coll., 2002 ; Lauwers et coll., 2003 ; Mochizuki et coll., 2006]. Même si le modèle murin existe, le rat et le primate non humain sont les espèces majoritairement choisies, car l'injection stéréotaxique dans la partie compacte de la substance noire est plus facilement réalisable. Ces modèles permettent de reproduire des stades intermédiaires de la maladie de Parkinson mais la stéréotaxie peut limiter la reproductibilité du modèle [Chesselet, 2008].

Modèles impliquant LRRK2

Une surexpression du gène *LRRK2* mutée en G2019S entraîne une diminution âge-dépendante du relargage et de la recapture de la dopamine [Li et coll., 2010]. Ces souris présentent des troubles moteurs progressifs âge-dépendants, avec une immobilité à l'âge de 10 mois réversibles par un traitement dopaminergique [Blandini et Armentero, 2012].

Modèles impliquant PINK1 ou PTEN-induced putative kinase 1

Les souris KO *PINK1* ne présentent pas de troubles majeurs, de perte de neurones dopaminergiques et de diminution du taux de dopamine striatal. Cependant ces souris présentent une anomalie mitochondriale et sont plus sensibles au stress oxydant et à la synthèse de ROS [Gautier et coll., 2008].

Modèles impliquant Parkin

Différents modèles murins KO *Parkin* ont été développés, mais aucun ne présentait de troubles comportementaux ou dopaminergiques. Cependant, ces souris sont plus sensibles aux stimuli inflammatoires et à la présence de

neurotoxines. Ces données suggèrent que ces mutations pourraient être associées à une hypersensibilité des neurones dopaminergiques aux agents neurotoxiques [Blandini et Armentero, 2012].

Modèles impliquant DJ-1

Etant donné que les mutations du gène *DJ-1* associées à une perte de fonction de la protéine sont un facteur de risque de développer la maladie de Parkinson, des souris KO ont été développées. Ces souris KO *DJ-1* sont également plus sensibles au stress oxydant et aux toxines, mais ne présentent pas de troubles neuronaux majeurs.

4.2.2 Pistes thérapeutiques

Les essais cliniques réalisés en France sont présentés ci-dessous par consultation du site clinicaltrials.gov, et ciblent ceux agissant principalement sur les troubles moteurs de la maladie.

D'une part, de nouvelles molécules de classes thérapeutiques existantes sont en essais, tels que la safinamide appartenant à la classe des IMAO-B, et l'opicapone appartenant à la classe des ICOMT. Plusieurs agonistes dopaminergiques de sélectivité différente sont en développement, notamment un agoniste dopaminergique D1-D5 (PF-06649751), un agoniste D2 (sumanirole), et la buspirone qui agit sur les récepteurs dopaminergiques présynaptiques. Certains traitements testés ont un profil plus large tels que le pardoprunox (agoniste dopaminergique, sérotoninergique et noradrénergique), et le sarizotan testé en tant qu'anti-dyskinétique (agoniste D2 et 5HT1A). De nouvelles cibles thérapeutiques ayant un mécanisme d'action similaire aux traitements symptomatiques actuels ont été testés, tels qu'un inhibiteur de la recapture de la mono-amine oxydase (Tesofensine) et un agoniste des récepteurs cholinergiques (aqw051).

D'autre part, de nouvelles formes galéniques ont été développées afin de stabiliser les concentrations cérébrales en dopamine. Notons des formes à libération prolongée d'amantadine, de ropinirole (agoniste dopaminergique), et de L-DOPA (IPX066). Concernant la L-DOPA, d'autres formulations ont été développées telles qu'une forme inhalée pour les patients fluctuants (Inbrila), et une solution liquide délivrée par pompe pour une administration continue par voie sous-cutanée.

Enfin, l'amélioration des connaissances physiopathologiques permet de développer différentes cibles thérapeutiques. De nombreux essais cliniques sont associés à la voie du glutamate, neurotransmetteur qui inhibe la sécrétion de dopamine. Ces thérapeutiques diminuent le relargage du glutamate ou ont une action antagoniste des récepteurs glutamatergiques (cvxl-0107, pérampantel, foliglurax, dipraglurant, mavoglurant). La deferiprone est également en essai dans la maladie de Parkinson contre la surcharge ferrique observée dans le cerveau des patients potentiellement neurotoxique, suite à des essais bénéfiques *in vivo* [Devos et coll., 2014]. Afin de limiter l'accumulation d' α -synucléine, un essai par immunothérapie contre cette protéine par voie intraveineuse est en cours (Prasinezumab). Actuellement, aucun traitement modulant le mécanisme physiopathologique de la maladie existe, mais des essais *in vivo* prévenant l'accumulation de l' α -synucléine par immunothérapie ont été prometteurs [Zella et coll., 2018]. Le traitement de souris Thy1-aSYN par des anticorps sélectifs des fibrilles et des oligomères d' α -synucléine a permis une amélioration de leur phénotype et une diminution du taux cérébral d' α -synucléine, de l'activation microgliale et de l'astroglie [Al-Agnaf et coll., 2017]. De plus, deux essais sont réalisés afin de majorer la synthèse de dopamine. L'infusion intrastriatale de 3 gènes impliqués dans la synthèse de dopamine est testée ainsi que l'administration de venin d'abeille contenant de l'apamine, une neurotoxine responsable d'une production majorée de dopamine par les neurones dopaminergiques. Les troubles métaboliques étant associés à un risque important de développer la maladie de Parkinson, le lixisenatide, traitement anti-GLP1, est associé au traitement antiparkinsonien pour étudier la progression des troubles moteurs. Enfin le venglustat, un inhibiteur de l'enzyme réverse de la glucocérébrosidase qui diminue la synthèse des glycosphingolipides, est en phase II testé chez les patients parkinsoniens présentant une mutation du gène *GBA* (ce qui représente 5 à 10% des patients atteints de la maladie de Parkinson).

II La place du métabolisme lipidique dans les maladies neurodégénératives

1. La prise alimentaire et le métabolisme énergétique dans les maladies neurodégénératives

Sont observés dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson une diminution de la masse corporelle et de la prise alimentaire [Aziz et coll., 2008]. De façon intéressante, cette variation de masse corporelle est associée à une apparition plus rapide des symptômes développés dans ces pathologies [Buchman et coll., 2005 ; Sharma et Vassallo, 2014 ; Van der Marck et coll., 2012].

La perte de poids résulte d'un déséquilibre entre la dépense énergétique et la prise alimentaire influencé par différents paramètres liés à la pathologie et à l'âge tels que des troubles psychiatriques et cognitifs, des troubles moteurs et des troubles métaboliques [Aziz et coll., 2008 ; De Boer et coll., 2013].

L'hypothalamus représente la région cérébrale majeure du contrôle de la prise alimentaire et de la balance énergétique, par la présence dans le noyau arqué de neurones anorexigènes (neurones pro-piomélanocortine ou POMC) et orexigènes (neurones à neuropeptide Y ou NPY, et les neurones *agouti related protein* ou AgRP) [Sam et coll., 2012 ; Gropp et coll., 2005]. Cette zone est régulée par différents signaux périphériques dont la leptine, la ghréline, l'insuline, le glucose et les acides gras [De Pablo-Fernandez et coll., 2017].

Tout d'abord la leptine est l'hormone majeure de la régulation de la prise alimentaire, de la thermogénèse et de la glycémie [Kwon et coll., 2016]. Celle-ci, produite principalement par les adipocytes, régule la prise de poids par réduction de l'appétit et augmente la dépense énergétique en inhibant les neurones NPY et AgRP et en stimulant les neurones POMC [Hays et Robert, 2006].

A l'inverse, la ghréline, synthétisée par la muqueuse gastrique au début d'un repas, va stimuler l'appétit, et engendrer un gain de poids corporel en activant les neurones NPY de l'hypothalamus [Cowley et coll., 2003].

Enfin, la troisième hormone impliquée est l'insuline. Sécrétée par les cellules β du pancréas, elle joue un rôle essentiel dans le transport cellulaire du glucose. Cette hormone régule la glycémie et est capable, comme la leptine, d'inhiber les neurones NPY et AgRP, et de stimuler les neurones POMC lors d'une diminution de la prise alimentaire [De Boer et coll., 2013].

Ces trois hormones dérégulées peuvent être également associées à un phénomène de perte neuronale dans les pathologies neurodégénératives.

Tout d'abord, la leptine présente, en plus d'un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire et la dépense énergétique, différentes fonctions dont une modulation des phénomènes apoptotiques et du stress oxydant mitochondrial, par interaction avec différentes voies de signalisation comme la voie PI3K/Akt/mTOR [Hegyí et coll., 2004]. Les récepteurs à la leptine sont présents dans l'hypothalamus mais également dans d'autres neurones tels que dans le cortex cérébral et l'hippocampe [Marwarha et coll., 2012]. Ainsi des études ont démontré un effet de la leptine sur la mémoire et l'apprentissage en agissant sur la plasticité synaptique [Farr et coll., 2006 ; Warren et coll., 2012]. Chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer, la leptine semble dérégulée avec une tendance à la baisse dans certaines études [Theodoropoulou et coll., 2012]. D'autre part, dans la maladie de Parkinson, une diminution de la leptinémie associée à une perte de masse corporelle a également été observée [Fischer et coll., 2010 ; Lorefält et coll., 2009].

De plus, la ghréline est une hormone neuroprotectrice dont le mécanisme est complexe. Elle diminuerait l'activation microgliale et atténuerait les événements toxiques liée à la fonction mitochondriale [Shi et coll., 2017]. De plus, elle jouerait un rôle dans la protection des neurones dopaminergiques [Andrews et coll., 2009]. Des études *in vivo* ont démontré un effet neuroprotecteur de la ghréline dans des modèles de maladie d'Alzheimer, avec un impact sur la mémoire [Shi et coll., 2017]. Alors que la concentration plasmatique en ghréline ne semble pas varier chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer [Proto et coll., 2006 ; Theodoropoulou et coll., 2012], le taux d'ARN messenger de la ghréline est diminué dans le lobe temporal de ces malades [Gahete et coll., 2010]. De plus, une diminution du taux plasmatique de ghréline a été observée chez les sujets atteints de la maladie de Parkinson à un stade précoce [Fischer et coll., 2010 ; Unger et col., 2011].

Enfin, une insulino-résistance, responsable d'une diminution de la capture du glucose dans les régions cérébrales, est observée chez les sujets atteints du diabète de type 2 mais également chez ceux atteints de la maladie d'Alzheimer [Kapogiannis et coll., 2015]. Celle-ci serait associée dans cette maladie neurodégénérative à une dérégulation de l'expression cérébrale des récepteurs à l'insuline et de la voie de signalisation de ces récepteurs [Steen et coll., 2005], avec une surexpression cérébrale de mTOR [Oddo, 2012]. Cette dérégulation pourrait entraîner une

neurodégénérescence et augmenter la progression des troubles cognitifs dans cette pathologie [Seward et coll., 2013 ; Khurana et coll., 2012 ; Talbot et coll., 2012].

Dans la maladie de Parkinson est détectée une diminution de la concentration cérébrale en insuline et des récepteurs à l'insuline dans la partie compacte de la substance noire [Spielman et coll., 2014]. De plus, malgré des résultats controversés, des études d'association suggère que le diabète de type 2 pourrait exercer un effet sur la progression et le phénotype de la maladie de Parkinson, avec des symptômes moteurs plus sévères moins sensibles à la L-DOPA [Cereda et coll., 2012].

Ainsi les troubles métaboliques dans ces maladies neurodégénératives sont actuellement peu compris mais pourraient avoir un rôle important dans la toxicité neuronale.

2. Généralités des sphingolipides

2.1 *Le métabolisme des sphingolipides*

Les sphingolipides sont des lipides complexes dont l'ossature structurale est formée par un céramide. La biosynthèse débute par la production de céramide dans le RE. Puis, suite à son transport dans l'appareil de Golgi, l'ajout d'un groupement plus ou moins complexe sur le radical hydroxyl du carbone en position 1 permet la formation de nombreux dérivés [Pruett et coll., 2008] (figure 5).

Tout d'abord, le ceramide-1-phosphate est synthétisé dans l'appareil de Golgi par ajout d'un groupement phosphate sur le céramide. Ensuite, des ajouts de groupements plus complexes permettent d'obtenir des classes de sphingolipides majeures : les sphingomyélines (par ajout d'un groupement phosphorycholine) et les glycosphingolipides (par liaison d'une chaîne mono, bi ou oligosaccharidique). Parmi ces glycosphingolipides, l'ajout en C1 d'un glucose permet d'obtenir la classe des glucosylcéramides (GlcCer), et l'ajout d'un galactose sur le GlcCer permet la formation du lactosylcéramide (LacCer), qui est le précurseur des gangliosides [Norris et Blesso, 2017].

Après leur synthèse, les sphingolipides atteignent la membrane plasmique principalement par fusion vésiculaire, où ils peuvent être modifiés. Puis, le catabolisme est majoritairement réalisé dans les lysosomes par voie d'endocytose [Kolter et Sandhoff, 2005]. Lors de cet acheminement, les sphingolipides de la

membrane plasmique peuvent être recyclés et détournés vers l'appareil de Golgi où ils subissent une glycosylation. C'est le mécanisme de sauvetage des gangliosides [Ghidoni et coll., 1987]. Le métabolisme des sphingolipides est principalement régulé par le taux d'expression des enzymes les synthétisant. De plus, la régulation du trafic intracellulaire des sphingolipides peut avoir également un impact dans la composition finale des sphingolipides de la membrane plasmique. Cette régulation est dépendante du type cellulaire et peut avoir un retentissement neuronal important [Riboni et coll., 1994].

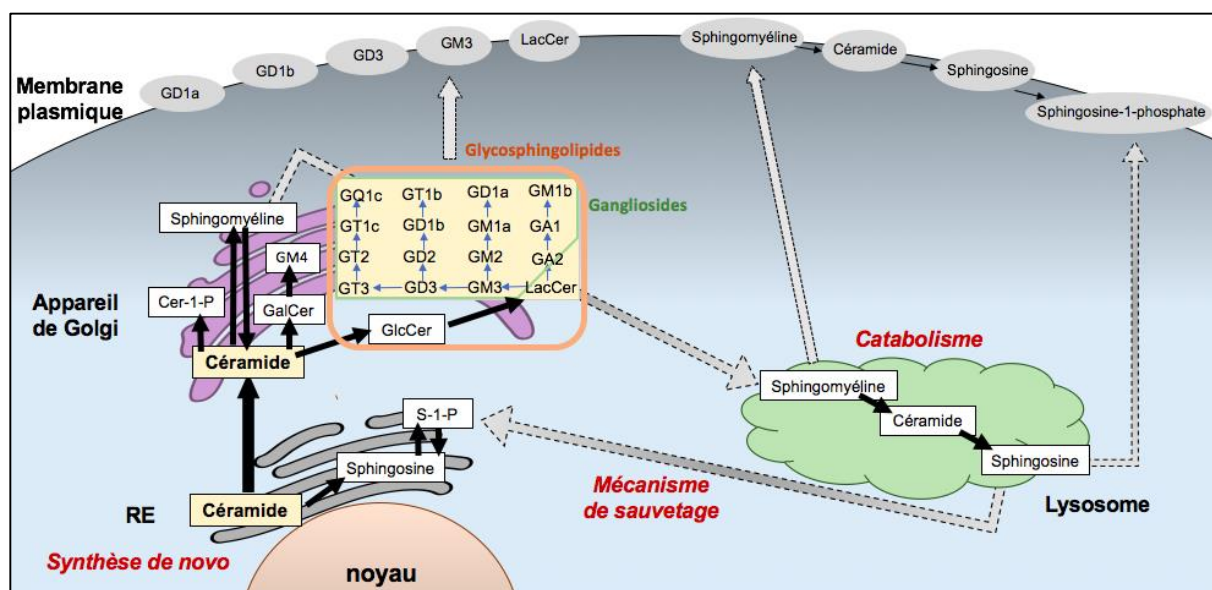


Figure 5 : Schématisation du métabolisme des gangliosides. La synthèse débute dans le RE puis est finalisée dans l'appareil de Golgi. Par transport vésiculaire les gangliosides peuvent atteindre la membrane plasmique. Puis l'endocytose entraîne une dégradation des sphingolipides par la voie lysosomale, où un recyclage peut être réalisé. RE = réticulum endoplasmique ; Cer-1-P = ceramide-1-phosphate ; GlcCer = glucosylcéramide ; LacCer = lactosylcéramide ; GalCer = galactosylcéramide. D'après Sandhoff, 2016.

2.2 La distribution et le rôle des sphingolipides

La distribution et la localisation des lipides dépendent de l'organe et du type cellulaire. Les sphingolipides sont observés dans les rafts lipidiques où le céramide, qui constitue la partie hydrophobe, permet son ancrage dans la bicouche lipidique [Prinetti et coll., 2001]. La composition membranaire des sphingolipides a un rôle important dans les propriétés cellulaires [Grassi et coll., 2018]. En effet, les sphingolipides diminuent la fluidité membranaire en interagissant avec le cholestérol, et régulent le processus de signalisation cellulaire en interagissant avec les protéines par modulation de l'organisation des sphingolipides membranaires, mais aussi par

interaction directe avec ces protéines [Sonnino et coll., 2007 ; Sonnino et Prinetti, 2013 ; Prinetti et coll., 2009].

Les sphingolipides sont présents dans le système nerveux central et ont un rôle important dans la fonction et le développement neurologique [Olsen et Faergaman, 2017]. En effet, la proportion de ces sphingolipides évolue lors de la différenciation du système nerveux, par variation de l'expression des sphingolipides synthases [Riboni et coll., 1990 ; Prinetti et coll., 2001 ; Yu et coll., 2009]. Lors des premiers stades de la différenciation, les sphingolipides sont présents en faible quantité, puis leur taux augmente lors du processus de différenciation, atteint un taux constant pendant plusieurs années, et diminue chez les sujets très âgés [Grassi et coll., 2018]. A l'âge adulte, les sphingomyélines sont des sphingolipides les plus abondants au niveau neuronal : ils représentent environ 85% des sphingolipides de la gaine de myéline, 10% des lipides cérébraux, et 10 à 20% des lipides membranaires du plasma humain. De plus, les sphingolipides influent l'inflammation, l'homéostasie tissulaire (croissance, survie, sénescence et apoptose) et la néovascularisation [Chiurchiu et Maccarrone, 2016]. D'une part, le céramide et le céramide-1-phosphate (C1P) sont associés à des pathologies auto-immunes et inflammatoires, car ils possèdent une activité pro-inflammatoire aigue et chronique en favorisant la voie des phospholipases A2 et la production de cytokines [Pettus et coll., 2004 ; Simanshu et coll., 2013]. De plus, leur accumulation peut être responsable d'une insulino-résistance, d'une obésité et un diabète de type 2 par activation de cellules immunitaires tels que les monocytes et les cellules B [Maceyka et Spiegel, 2014 ; Gomez-Munoz et coll., 2016 ; Vandanmagsar et coll., 2011 ; Gomez-Munoz et coll., 2016].

D'autre part, les gangliosides sont présents dans le système nerveux, et particulièrement au niveau ganglionnaire [Posse de Chaves et Sipione, 2010 ; Wiegandt, 1995 ; Russo et coll., 2018]. La nomenclature la plus utilisée pour nommer les gangliosides est celle de Svennerholm : la première lettre G, liée au nom de ganglioside, est suivi d'un M, D, T ou Q selon le nombre d'acide sialique greffé (entre 1 et 4 respectivement). Par exemple, GM3 résulte de l'ajout d'un acide sialique. Le chiffre 3 est associé à la migration en chromatographie en couche mince : plus le ganglioside migre, plus le chiffre est important. Enfin, les gangliosides ont des chaînes saccharidiques complexes issues de différentes modifications, qui les classent en série a, b, et c selon le point de ramification [Schnaar et coll., 2009]. La fonction physiologique des gangliosides est encore peu connue mais ils joueraient un

rôle dans la croissance, la différenciation cellulaire et la réaction immunitaire [Schengrund, 2015 ; Lopez et Schnaar, 2009], et stabiliseraient les membranes plasmiques neuronales [Mori et coll., 2012]. En effet, les gangliosides GD1a et GT1b stabilisent l'interaction myéline – axone au niveau axonal et la rendent efficiente en se liant aux protéines basiques de la myéline [Schnaar, 2016 ; Yang et coll., 1996 ; Sandhoff et Sandhoff 2018 ; Mullin et coll., 1981]. D'autre part, leur partie glycane, hydrophile, est orientée vers la surface cellulaire et est impliquée dans le processus d'adhésion cellulaire [Schnaar, 2016 ; Handa et Hakomori, 2012]. Cette partie peut moduler l'activité des protéines membranaires tels que les récepteurs à la leptine et à l'insuline [Inokuchi, 2010 ; Nordstrom et coll., 2013 ; Todeschini et coll., 2008 ; Ohmi et coll., 2012 ; Ledeen et coll., 2012 ; Lipina et Hundal, 2015]. Enfin, le métabolisme des gangliosides pourrait être sensible à l'état nutritionnel. En effet un régime gras pourrait augmenter la synthèse des sphingolipides C16, et notamment GM3, qui à son tour peut diminuer l'activité du récepteur à insuline et influencer le syndrome métabolique et le diabète de type 2 [Lipina et Hundal, 2015 ; Scheel et coll., 1982].

3. Les atteintes neurologiques associées à une maladie de surcharge lysosomale

3.1 Définition d'une maladie de surcharge lysosomale

Les maladies de surcharge lysosomale (MSL) représentent un groupe de pathologies génétiques liées à une diminution voire à une absence d'activité enzymatique lysosomale, ou à une anomalie de protéines lysosomales membranaires dont certaines n'ont pas de fonction connue à ce jour. Plus de 70 pathologies sont décrites, et leur prévalence globale est d'une naissance sur 8000 [Grassi et coll., 2018 ; Schultz et coll., 2011].

Ces pathologies sont caractérisées par une accumulation progressive de matériel biologique dans les lysosomes de différents organes tels que les viscères, le squelette, la peau, le cœur et le système nerveux central. La présentation clinique reflète les taux résiduels d'activité enzymatique : les formes infantiles présentent peu ou pas de fonction enzymatique alors que les formes adolescentes ou adultes ont une fonction enzymatique résiduelle modérée [Rigante et coll., 2017].

Le renouvellement des protéines et des organites dépend de la coopération des voies de l'autophagie et du lysosome. Or, le déficit d'enzyme lysosomale trouble la fusion autophagosome-lysosome et entraîne une accumulation de macromolécules non dégradées comme les lipides complexes, les mucopolysaccharides et d'autres substrats biologiques [Settembre et coll., 2008].

Mis à part la perte totale de la glucosylcéramide synthase (responsable de la production de glycosphingolipides) qui est incompatible avec un développement embryonnaire, les autres MSL sont viables et entraînent majoritairement des troubles neurologiques progressifs observés dès l'enfance ou l'adolescence (tableau II). Il est à noter que les maladies de surcharge lysosomale représentent la cause majeure de neurodégénérescence chez les enfants [Verity et coll., 2010].

Tableau II : Les maladies impliquant le métabolisme des glucosylsphingolipides. Des troubles neurologiques sont souvent associés à ces pathologies. MSL = maladie de surcharge lysosomale, GlcCer = glucosylcéramide, GBA = glucocérébrosidase. D'après la revue de Platt de 2014.

Type de trouble métabolique	Nom de la pathologie	Anomalie biochimique	Type de protéine défectueuse	Signes cliniques majeurs	Pathologie neurologique
Biosynthèse	Anomalie de la synthèse de GM3	Perte de GM3 et de ses dérivés gangliosidiques	GM3 synthase	Épilepsie apparaissant dans l'enfance, anomalie du développement, perte de la vision	oui
Biosynthèse	Anomalie de la synthèse de GM2	Perte de GM2 et de ses dérivés gangliosidiques	GM2 synthase	Paraplégie spastique	oui
Catabolisme (MSL)	Maladie de Gaucher de type 1, 2 et 3	Surcharge en GlcCer	GBA	Hépatosplénomégalie, troubles hématologiques et inflammatoires, troubles osseux et cérébraux	Type 2 et 3
Catabolisme (MSL)	Maladie de Fabry	Surcharge en Gb3	α -galactosidase	Troubles rénaux et cardiovasculaires, douleurs périphériques	oui
Catabolisme (MSL)	Maladie de Tay-Sachs	Surcharge en gangliosides GM2	β -hexosaminidase sous unité α	Neurodégénérescence progressive	oui
Catabolisme (MSL)	Maladie de Sandhoff	Surcharge en gangliosides GM2	β -hexosaminidase sous unité β	Neurodégénérescence progressive	oui
Catabolisme (MSL)	Gangliosidoses GM1	Surcharge en gangliosides GM1	β -galactosidase	Neurodégénérescence progressive	oui
Anomalie dans le trafic ou la fusion lysosomale	Maladie de Niemann-Pick de type C	Surcharge en glycosphingolipides, cholestérol, sphingosine et sphingomyéline	NPC1 et NPC2	Neurodégénérescence progressive	oui

Les sujets atteints d'une MSL peuvent présenter un tremblement, une bradykinésie, une rigidité et un déclin cognitif [Deng et coll., 2015]. Les mutations des gènes *GBA*, *SMPD1* et *NPC1* responsables de MSL sont également associées à la maladie de Parkinson [Foo et coll., 2013 ; Gan-Or et coll., 2013]. Ces observations suggèrent un

lien entre la maladie de Parkinson et les MSL, où le variant de certains gènes augmenterait la susceptibilité de développer la maladie de Parkinson.

3.2 *Signes cliniques neurologiques associés aux principales maladies de surcharge lysosomale*

3.2.1 La maladie de Gaucher

La maladie de Gaucher est la MSL la plus fréquente, causée par la mutation homozygote ou hétérozygote composée du gène *GBA1* dans la majorité des cas [Hruska et coll., 2008]. En effet, de rares cas sont causés par la mutation du gène *PSAP* qui code pour la prosaposine, une glycoprotéine lysosomale précurseur de cofacteurs essentiels des sphingolipides hydrolases [Vaccaro et coll., 2010 ; Tamargo et coll., 2012]. Cette pathologie entraîne la présence de macrophages engorgés caractéristiques appelés macrophages ou cellules de Gaucher, qui accumulent les glycolipides dans les lysosomes par digestion défectueuse d'érythrocytes, de leucocytes âgés et de glucosylcéramides [Machaczka et coll., 2011 ; Pennelli et coll., 1969 ; Pastores, 1997 ; Hughes et Pastores, 2013 ; Moskot et coll., 2018 ; Stirnemann et coll., 2017]. Ces cellules infiltrent différents organes et contribuent aux signes cliniques de la maladie tels qu'une organomégalie, un trouble osseux et une cytopénie. De plus, dans les cas sévères, les macrophages relarguent des cytokines pro-inflammatoires en réponse aux stimuli [Michelakakis et coll., 1996 ; Allen et coll., 1997 ; Barak et coll., 1999]. Cette activation inflammatoire peut contribuer à une organomégalie massive, un trouble osseux et à la survenue de certains cancers [Mistry et coll., 2005].

Les signes cliniques hétérogènes observés chez les patients atteints de la maladie de Gaucher permettent de classifier la maladie en 3 groupes [Grabowski, 2008]. Le type 1 représente 90% des cas et est défini comme la forme non neurologique ; cependant certains malades présentent un syndrome parkinsonien, une démence ou une neuropathie périphérique [Deng et coll., 2015 ; Neudorfer et coll., 1996]. Les types 2 et 3 présentent quant à elles une neurodégénérescence d'évolution rapide et progressive respectivement [Stirnemann et coll., 2017]. Bien que la mutation du gène *GBA* n'impacte pas le risque de développer une maladie d'Alzheimer [Tsuang et coll., 2012], celle-ci augmente le risque de développer une démence à corps de Lewy d'un facteur 8 et une maladie de Parkinson d'un facteur 5 [Sidransky et coll., 2009 ; Goker-Alpan et coll., 2006]. Des études ont démontré la

présence d'inclusions d' α -synucléine, similaires aux corps de Lewy, dans l'hippocampe de sujets atteints de la maladie de Gaucher [Wong et coll., 2004 ; Sidransky et coll., 2012]. Le risque de développer la maladie de Parkinson est de 9 à 12 % avant l'âge de 80 ans chez ces malades, contre 2,6% dans la population générale [Goker-Alpan et coll., 2012]. Ces malades présentent alors une akinésie et une rigidité bilatérale répondant faiblement à la L-DOPA [Bembi et coll., 2003 ; Neudorfer et coll., 1996 ; Machaczka et coll., 1999 ; Kraoua et coll., 2009].

3.2.2 La maladie de Fabry

Cette maladie liée à l'X présente une mutation du gène *GLA*, responsable d'une perte de fonction de l' α -galactosidase de type A qui entraîne une accumulation précoce et progressive de Gb3 ou de globotriaosylcéramides [Zarate et Hopkin, 2008]. Elle représente la deuxième MSL la plus fréquente où le phénotype varie selon différents facteurs, tels que le génotype et le sexe. Les patients présentent des douleurs neuropathiques aux extrémités dès leur enfance [Schiffmann et Ries, 2016] et peuvent développer des accidents vasculaires cérébraux précoces, des cardiomyopathies ainsi que des troubles dermatologiques et rénaux tardifs [Nagueh, 2014]. Parmi ces malades, 3 cas ont présenté un syndrome parkinsonien, mais aucune étude n'a observé d'association entre le gène *GLA* et la maladie de Parkinson [Deng et coll., 2015].

3.2.3 La maladie de Niemann-Pick

Cette pathologie neurodégénérative à transmission autosomique récessive est caractérisée par une accumulation de cholestérol non estérifié dans différents tissus dont le cerveau. En fonction du gène muté, cette maladie est subdivisée en type A, B, C1 et C2. Les pathologies de type A et B sont associées à la mutation du gène *SMPD1*, responsable d'une perte d'activité de la sphingomyelinase, qui joue un rôle important dans le métabolisme des membranes plasmiques [Rigante et coll., 2017]. Ces maladies présentent une altération du métabolisme des phospholipides et de la distribution lipidique au niveau cérébral, ainsi qu'une neurodégénérescence progressive. D'une part, le type A est associé à un retard psychomoteur et à une neurodégénérescence rapide conduisant à la mort chez le jeune enfant (vers l'âge de 3 ans). Et d'autre part, le type B est associée à une forme pathologique viscérale d'apparition plus tardive et sans signe neurologique apparent, où les patients survivent jusqu'à l'âge adulte. Les types C1 et C2 sont associés respectivement à

une mutation du gène *NPC1* (95% des cas) et *NPC2* [Schuchman et Desnick, 2017]. Cette forme subaigue ou juvénile est caractérisée par un trouble du transport du cholestérol et une accumulation du cholestérol non estérifié dans l'endosome tardif [Vanier, 2010]. Les formes C1 de la maladie présentent un blocage de la voie autophagique et des anomalies du trafic lipidique intracellulaire générant un excès de glycosphingolipides dans le cerveau, le foie et d'autres tissus.

Comme pour la maladie de Gaucher, la maladie de Niemann-Pick est associée à un risque plus important de développer la maladie de Parkinson [Gan-Or et coll., 2013 ; Klunemann et coll., 2013]. Un syndrome parkinsonien a été observé dans tous les sous-types de la maladie de Niemann-Pick [Vykuntaraju et coll., 2012 ; Volders et coll., 2002 ; Coleman et coll., 1988 ; Josephs et coll., 2004 ; Zech et coll., 2013]. De plus, les patients atteints de Niemann-Pick de type C présentent de l' α -synucléine et des corps de Lewy dans la partie compacte de la substance noire [Saito et coll., 2004], mais également une dégénérescence neurofibrillaire associée à une accumulation de la protéine tau [Malnar et coll., 2014]. La dérégulation du trafic du cholestérol associé à une augmentation des dépôts de cholestérol dans les neurones a été détectée dans la maladie de Niemann-Pick de type C, de Parkinson et d'Alzheimer, suggérant un rôle pathogénique de ces lipides [Liu et coll., 2010].

3.2.4 Les gangliosidoses

Etant donné que les gangliosides sont fortement présents dans le système nerveux central, les pathologies associées présentent une neurodégénérescence progressive et une macula rouge, issu de l'accumulation rétinienne de différents précurseurs. Parmi ces patients, 7,5 à 48% d'entre eux présentent un syndrome parkinsonien [Muthane et coll., 2004 ; Inzelberg et Korczyn, 1994].

Basé sur ce déficit en GM1 dans les neurones dopaminergiques, l'administration chez des sujets parkinsoniens de gangliosides GM1 par voie sous-cutanée pendant 5 ans a permis d'améliorer les signes moteurs et les activités de la vie quotidienne [Schneider et coll., 2010].

3.2.5 La maladie de Tay-Sachs et de Sandhoff

Ce sont des gangliosidoses GM2 causées par un déficit en β -hexosaminidase de type A liée à la mutation respective du gène *HEXA* pour la maladie de Tay-Sachs et de *HEXB* pour la maladie de Sandhoff [Regier et coll., 2016]. Contrairement à la gangliosidose GM1, cette maladie est uniquement associée à un trouble cérébral.

Une diminution de l'activité enzymatique de la β -hexosaminidase est également observée dans le LCR de patients parkinsoniens [Balducci et coll., 2007], mais aucune mutation codant les gènes *HEXA* et *HEXB* chez les sujets parkinsoniens n'a été reportée dans la littérature.

4. La glucocérébrosidase dans la maladie de Parkinson

4.1 *Dérégulation de la glucocérébrosidase dans la maladie de Parkinson*

Plus de la moitié des patients parkinsoniens présentent une ou plusieurs variations génétiques parmi les 54 gènes impliqués dans une MSL [Robak et coll., 2017]. Particulièrement, la fréquence des mutations du gène *GBA1*, responsable d'une perte de fonction de la glucocérébrosidase lysosomale, est cinq fois plus élevée chez les parkinsoniens que chez les sujets sains [Goker-Alpan et coll., 2004]. Cette diminution d'activité enzymatique est associée à une apparition précoce de la maladie, à la présence d'hallucinations et de troubles cognitifs [Neumann et coll., 2009].

Cependant, l'association entre la présence de mutations du gène *GBA1* et l'apparition précoce de troubles neuropsychiatriques est controversé dans la littérature [Brockmann et coll., 2012 ; Winder-Rhodes et coll., 2013 ; Aharon-Peretz et coll., 2005 ; Parkkinen et coll., 2011]. D'une part, les taux plasmatiques de céramides et de glucosylsphingolipides sont altérés chez des sujets parkinsoniens développant un trouble cognitif sans mutation *GBA1* [Alcalay et coll., 2012]. Et d'autre part, l'activité de la glucocérébrosidase est diminuée dans le sang, le LCR et le cerveau des patients atteints de maladie de Parkinson présentant ou non une mutation du gène *GBA1* [Balducci et coll., 2007 ; Parnetti et coll., 2009 ; Gegg et coll., 2012 ; Murphy et Halliday, 2014 ; Alcalay et coll., 2015]. Des études complémentaires pourraient suggérer que l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase lysosomale soit un marqueur potentiel de la sévérité des formes idiopathiques de la maladie de Parkinson [Alcalay et coll., 2015].

La voie métabolique des céramides semble être impliquée dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson, mais le mécanisme reste inconnu [Mielke et coll., 2013]. L'analyse transcriptomique des cellules mononuclées périphériques de sujets parkinsoniens montre des dérèglements des voies liées au métabolisme des sphingolipides et à la signalisation des céramides [Mutez et coll., 2014]. Au niveau

cérébral, les taux de céramides et de sphingomyélines sont diminués de 53% et de 42% respectivement par rapport aux contrôles, et sont associés à une modification de la composition lipidique. Cependant, malgré une augmentation des glucosylsphingosines chez les sujets atteints de la maladie de Gaucher, ces taux ne semblent pas varier dans le putamen et le cervelet des patients parkinsoniens avec et sans mutations du gène *GBA1* [Gegg et coll., 2015].

Même si la maladie de Gaucher est associée à un risque plus important de développer la maladie de Parkinson ou toute autre synucléinopathie [Saffari et coll., 2017], la diminution de l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase lysosomale ne semble pas être suffisante car la majorité des sujets atteints de la maladie de Gaucher ne présente pas de syndrome parkinsonien [Rosenbloom et coll., 2011]. Ainsi un mécanisme additionnel à cette perte d'activité enzymatique pourrait être responsable de cette neurodégénérescence [Mazzulli et coll., 2011 ; Sidransky et Lopez, 2012].

Il est à noter que l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale représente 15% du métabolisme total des glucocérébrosides. En effet, diverses glucocérébrosidases sont codées par différents gènes, dont l'activité principale est réalisée par la glucocérébrosidase non lysosomale, codée par le gène *GBA2* [Boot et coll., 2007 ; Butters, 2007]. La délétion du gène *GBA2* est aussi liée à des troubles neurologiques telles qu'une ataxie cérébelleuse et une paraplégie spastique [Sultana et coll., 2015]. Son activité est dépendante de la glucocérébrosidase lysosomale : l'activité de la glucocérébrosidase non lysosomale est augmentée dans les leucocytes de patients atteints de la maladie de Gaucher, et pourrait contrer la diminution de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale [Barkhuizen et coll., 2016]. Cependant, la régulation dans le sens inverse n'a pas été constatée et aucune compensation n'a été observée en cas de perte d'activité de la glucocérébrosidase non lysosomale [Burke et coll., 2013 ; Korschen et coll., 2013], ce qui suggère un système de régulation plus complexe.

4.2 Mécanismes communs potentiellement impliqués dans la maladie de Parkinson et les maladies de surcharge lysosomale

4.2.1 Les formes pathologiques de l' α -synucléine

De l' α -synucléine agrégée a été décrite dans différentes MSL telles que la maladie de Newman-Pick de type C1, la maladie de Gaucher et la maladie de

Krabbe [Shachar et coll., 2011 ; Ginns et coll., 2014 ; Mazzulli et coll., 2011]. Cette accumulation peut être liée aux altérations de l'autophagie car l' α -synucléine est éliminée de moitié par l'autophagie médiée par la protéine chaperone [Cuervo et coll., 2004]. Alors que le taux plasmatique des monomères d' α -synucléine ne semble pas varier, le taux plasmatique des oligomères d' α -synucléine est plus élevé chez les patients atteints de MSL (maladie de Gaucher juvénile, Niemann-Pick C, Krabbe, Wolman) et son augmentation est corrélée à l'âge du malade [Argyriou et coll., 2012 ; Kang et coll., 2014 ; Pchelina et coll., 2014].

4.2.2 L'inflammation

Certaines MSL ont été associées à des troubles du système immunitaire, tout comme la maladie de Parkinson.

Différentes études suggèrent que l'inflammation peut avoir un rôle dans le phénotype pathogène de la maladie de Gaucher. La stimulation chronique du système immunitaire dans cette maladie conduit à la synthèse d'immunoglobulines polyclonales, qui peut engendrer un myélome multiple [Shoenfeld et coll., 1982]. Différentes cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF α sont libérées par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques dans la maladie de Gaucher [Barak et coll., 1999]. Les lymphocytes T semblent jouer un rôle dans la maladie de Gaucher de type 1. En effet, ces malades présentent une diminution plasmatique des lymphocytes T CD4⁺ et NK, une augmentation des lymphocytes T CD8⁺ entraînant une inversion du ratio CD4⁺/CD8⁺ et une augmentation des taux de lymphocytes T activés [Matta et coll., 2016 ; Sotiropoulos et coll., 2015 ; Braudeau et coll., 2013 ; Zahran et coll., 2017].

D'autre part, dans la maladie de Fabry, l'accumulation de Gb3 semble être le point de départ de la réponse immunitaire par surexpression de cytokines pro-inflammatoires [Mauhin et coll., 2015]. Les glycosphingolipides sont reconnus comme des antigènes par les cellules NK, qui induisent un relargage de différents médiateurs tels que l'IFN γ , TNF α , IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et IL-17. Les cultures de cellules sanguines périphériques de patients atteints de la maladie de Fabry présentent une proportion importante de cellules dendritiques et de monocytes, qui sécrètent différentes cytokines et chémokines [De francesco et coll., 2013].

Enfin, les sujets atteints de la maladie de Niemann-Pick présentent une activation microgliale inappropriée. Des interactions entre les réactions métaboliques, inflammatoires et immunologiques ont été observées dans cette maladie, suggérant

que l'activation de l'immunité innée et adaptative contribueraient au phénotype neurologique des gangliosidoses [Rigante et coll., 2017].

4.2.3 La voie autophagie-lysosome

Le dérèglement de la fonction autophagique est associé aux MSL mais également à différentes pathologies neurodégénératives tels que la maladie de Parkinson, d'Alzheimer et la chorée de Huntington [Di Malta et coll., 2012]. Des études génétiques suggèrent que cette diminution de la capacité autophagique contribue à la neurodégénérescence des MSL [Di Malta et coll., 2012]. D'autre part, différents gènes codant des protéines impliquées dans la voie autophagie-lysosome sont associés à un risque plus important de développer la maladie de Parkinson, tels que *SNCA*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1*, *DJ1* et *ATP13A2* [Seregin et Amalfitano, 2011].

4.2.4 Le stress oxydant

Des études *post-mortem* montrent des troubles mitochondriaux, du système anti-oxydant et des dommages oxydatifs dans le cerveau de sujets parkinsoniens, suggérant le rôle du stress oxydant dans la pathogénèse [Jenner et Olanow, 1996 ; Jenner, 2003]. L'augmentation des ROS et du stress oxydant ont été également observées dans plusieurs MSL, indiquant que les ROS sont des médiateurs communs de mort cellulaire dans ces pathologies [Vitner et coll., 2010].

4.2.5 Dysfonction mitochondriale

Une altération mitochondriale est observée dans des MSL et également dans des pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Des altérations de la fonction, de la morphologie et de la masse mitochondriale ont été identifiées dans des MSL. Les troubles mitochondriaux sont associés à deux événements : la production excessive de ROS et la dérégulation de l'homéostasie calcique mitochondrial. Ces événements, observées dans différents modèles de MSL et de la maladie de Parkinson, peuvent contribuer à la neurodégénérescence [Voccoli et coll., 2014 ; Torres et coll., 2016 ; Rama Rao et Kielian, 2016 ; Saffari et coll., 2017 ; Plotegher et Duchon, 2017].

4.2.6 L'homéostasie calcique

La surexpression de l' α -synucléine semble augmenter l'influx calcique mitochondrial par relargage de calcium du RE vers la mitochondrie [Cali et coll., 2012]. Les études sur des échantillons cérébraux de sujets parkinsoniens révèlent une augmentation du taux de la calbindine (protéine de transport du calcium) protégeant les neurones dopaminergiques de la neurodégénérescence [Yamada et coll., 1990]. Des altérations sont également observées au niveau du RE dans les MSL. D'une part, une augmentation du relargage du calcium est détectée dans les tissus cérébraux de patients atteints de la maladie de Gaucher. Et d'autre part, une diminution de la recapture calcique a été observée dans les gangliosidoses GM1 et GM2 [Ballabio, 2009].

III L' α -synucléine, la glucocérébrosidase et l'inflammation : un lien responsable d'une dérégulation précoce dans la maladie de Parkinson ?

Différents mécanismes physiopathologiques apparaissent précocément et progressivement dans la maladie de Parkinson, dont une accumulation d' α -synucléine [Braak et coll., 2003] et une neuroinflammation [Hirsch et Hunot, 2009].

L'activité de la glucocérébrosidase lysosomale cérébrale est diminuée chez les sujets parkinsoniens présentant ou non une mutation de l'enzyme *GBA1*, suggérant que le métabolisme des glucocérébrosides joue un rôle dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson [Gegg et coll., 2012].

La figure 6 représente les liens entre ce métabolisme des glucocérébrosides, l'accumulation d' α -synucléine et l'inflammation. Aux vues de ces liens décrits dans ce paragraphe, il est raisonnable de suggérer que ces troubles soient dérégulés précocément et qu'ils pourraient contribuer au développement de cette maladie neurodégénérative. Les arguments détaillés sont décrits aux paragraphes ci-dessous.

1. L'accumulation de l' α -synucléine et l'activation du système immunitaire : deux signes précoces engendrant le mécanisme physiopathologique de la maladie ?

L' α -synucléine s'accumule progressivement chez les sujets parkinsoniens dès la forme pré-clinique de la maladie [Braak et coll., 2003 ; Del Tredici et coll., 2002 ; Dickson et coll., 2008 ; Beach et coll., 2008]. Or le système inflammatoire peut être activé par la présence d' α -synucléine [Croisier et coll., 2005 ; Kim et De Vellis, 2005 ; Klegeris et coll., 2008]. Des études *in vivo* et *in vitro* montrent une synergie entre l'accumulation de l' α -synucléine et l'inflammation qui induit une neurodégénérescence, suggérant que cette accumulation protéique pourrait être responsable d'une inflammation, notamment dans la substance noire des patients atteints de la maladie de Parkinson où l' α -synucléine est retrouvée en quantité importante [Su et coll., 2008 et 2009 ; Couch et coll., 2011 ; Lawson et coll., 1990]. En imagerie, l'activation microgliale de la substance noire des sujets parkinsoniens est présente dès les phases précoces de la maladie et augmente avec la sévérité des troubles moteurs [Gerhard et coll., 2006 ; Ouchi et coll., 2005]. De plus, une corrélation positive est également observée entre l'activation microgliale, la durée de la pathologie et la quantité d' α -synucléine [Croisier et coll., 2005]. Ceci suggère le rôle majeur de l'activation microgliale dans le développement de la pathologie et dans les dommages neuronaux observés dans les synucléinopathies [Imamura et coll., 2003 ; Block et coll., 2007].

1.1 Impact de l' α -synucléine sur l'inflammation

L' α -synucléine est exprimée dans une grande variété de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, B, NK, et les monocytes [Shin et coll., 2000 ; Su et coll., 2004 ; Wu et coll., 2009 ; Austin et coll., 2006].

Cette protéine a un rôle dans l'homéostasie de la microglie : les souris ayant une délétion du gène *SNCA* présentent des microglies plus activées et une altération de la phagocytose [Austin et coll., 2006 et 2011]. D'autre part, l' α -synucléine accumulée dans la maladie de Parkinson, ou surexprimée dans des études *in vitro*, entraîne une activation microgliale et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [Croisier et coll., 2005 ; Kim et De Vellis, 2005 ; Klegeris et coll., 2008 ; Alvarez-Erviti et coll., 2011].

De plus, les oligomères d' α -synucléine sont trop larges pour être internalisés par voie d'endocytose, ce qui entraînent une rupture de ces vésicules et une augmentation des ROS [Freeman et coll., 2013]. Egalement, l' α -synucléine peut induire une synthèse de ROS en activant la NADPH-oxydase.

Enfin, l'augmentation de ce taux d' α -synucléine dans les cellules immunitaires peut altérer l'autophagie, qui a un rôle majeur dans la maintenance, l'activation et la prolifération des lymphocytes T [Lu et Walsh, 2012].

1.2 Impact de l'inflammation sur l' α -synucléine

L'administration du composé pro-inflammatoire LPS dans des macrophages humains augmente le taux d' α -synucléine, ce qui suggère un rôle de l' α -synucléine dans le processus inflammatoire et la réponse immune [Tanji et coll., 2002].

Au niveau neuronal, un stress oxydatif peut activer PP2A et induire une phosphorylation de l' α -synucléine en serine 129 [Foley et coll., 2007].

Dans la maladie de Parkinson, le taux d'anticorps anti- α -synucléine est diminué par rapport aux sujets sains ou ceux atteints d'une autre pathologie neurodégénérative. Ce taux d'anticorps n'est pas corrélé à l'âge, à la durée et à la sévérité de la pathologie, mais il pourrait promouvoir une propagation de l' α -synucléine [Besong-Agbo et coll., 2013].

2. L'accumulation de l' α -synucléine et la diminution de l'activité de la glucocérébrosidase : un rétrocontrôle majorant les troubles de la maladie ?

Les patients atteints de la maladie de Gaucher ont 3 fois plus d' α -synucléine oligomérique dans le plasma que les sujets sains [Pchelina et coll., 2014]. De plus, dans cette pathologie où les glucocérébrosides s'accumulent, une corrélation positive entre l'âge et le ratio sanguin des formes dimériques/monomériques d' α -synucléines a été observée [Argyriou et coll., 2012]. Le rétrocontrôle entre la perte d'activité de la glucocérébrosidase et l'accumulation d' α -synucléine est présenté par différents mécanismes physiologiques.

2.1 Impact de la diminution de l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase lysosomale sur l' α -synucléine

2.1.1 Accumulation de l' α -synucléine

La glucocérébrosidase peut se lier à l' α -synucléine par son extrémité C-terminal à pH acide, et former un complexe dans le lysosome afin de dégrader ou d'inhiber l'agrégation de l' α -synucléine. L'interaction à pH acide suggère que le lysosome est un site primaire d'interaction entre la glucocérébrosidase et l' α -synucléine [Yap et coll., 2011]. En effet, l'inhibition pharmacologique de la glucocérébrosidase lysosomale par le conduritol- β -époxyde augmente les taux d' α -synucléine *in vivo* et *in vitro* [Manning-Bog et coll., 2009].

Ainsi une diminution de cette activité enzymatique va être associée à une accumulation d' α -synucléine [McGlinchey et Lee, 2013]. Des études *in vivo* dans un modèle murin de Gaucher démontrent que l'augmentation de l'activité glucocérébrosidase lysosomale diminue l'agrégation de l' α -synucléine [Sardi et coll., 2013]. Ceci suggère l'importance de la modulation de la glucocérébrosidase dans la progression des synucléinopathies.

D'autre part, la mutation de la glucocérébrosidase semble majorer cette accumulation protéique. Les formes mutées diminuent l'affinité de la glucocérébrosidase à l' α -synucléine, et troublent potentiellement sa dégradation lysosomale [Yap et coll., 2011]. Les souris présentant des mutations de *GBA1* promeuvent l'accumulation de l' α -synucléine par rapport aux modèles murins sans mutation [Cullen et coll., 2011 ; Xu et coll., 2011]. Ces mutations contribueraient à une agrégation abérante d' α -synucléine et augmenteraient son taux intracellulaire [Manning-Bog et coll., 2009 ; Velayati et coll., 2010].

2.1.2 Formes pathologiques de l' α -synucléine

La perte de fonction de la glucocérébrosidase stabiliserait les oligomères d' α -synucléine solubles. En effet, une étude *in vivo* à pH acide démontre que les sphingolipides accumulés affectent la conformation et la solubilité de l' α -synucléine en stabilisant les formes intermédiaires [Mazzulli et coll., 2011]. Des résultats similaires sont obtenus *in vitro* dans des cellules neuronales, où l'augmentation de la quantité de GlcCer à 75% altère le profil cinétique des fibrilles d' α -synucléine et stabilise les formes oligomériques. De plus, la diminution de l'activité enzymatique de

la glucocérébrosidase peut augmenter la phosphorylation de l' α -synucléine en sérine 129 qui est responsable d'une oligomérisation de cette protéine [Walker et coll., 2013]. La stabilisation des formes oligomériques d' α -synucléine par ces différents mécanismes peut être impliquée dans le mécanisme de neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson.

A l'inverse, l'administration par vecteur viral de la glucocérébrosidase dans le cerveau d'un modèle murin de la maladie de Parkinson (α SYN A53T) et de la maladie de Gaucher ($Gba^{D409V/D409V}$) diminue l'accumulation de glucosylsphingosine et d'ubiquitine, de tau et des agrégats d' α -synucléine protéinase K résistants. Après 2 mois de traitement, cette surexpression est associée à une amélioration des troubles cognitifs chez ces souris [Sardi et coll., 2011 et 2013].

Néanmoins, l'absence de formes oligomériques d' α -synucléine dans la maladie de Gaucher de type 1 indique que d'autres facteurs associés à la diminution de l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase lysosomale peuvent contribuer à l'oligomérisation de l' α -synucléine. Par exemple, l'oxydation et la nitration de l' α -synucléine stabilisent les oligomères d' α -synucléine et altère leur élimination *in vitro* [Hodara et coll., 2004].

2.2 Impact de l'accumulation de l' α -synucléine sur l'activité de la glucocérébrosidase

2.2.1 Dérégulation du trafic réticulum endoplasmique-Golgi

Des études *in vivo* et *in vitro* indiquent que la surexpression de l' α -synucléine entrave le trafic protéique RE-Golgi en inhibant le complexe SNARE [Cooper et coll., 2006 ; Thayanidhi et coll., 2010]. Une étude *in vitro* sur des cellules pluripotentes humaines neuronales suggère que l'accumulation et l'agrégation de l' α -synucléine va déstabiliser le trafic de la glucocérébrosidase dans la voie du RE-Golgi, entraînant une perte de fonction de cette enzyme [Mazulli et coll., 2011 ; Cooper et coll., 2006]. Cette perte de fonction va entraîner une accumulation d' α -synucléine, qui à son tour va inhiber le trafic et l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale, engendrant une auto-propagation de ce mécanisme physiopathologique [McGlinchey et Lee, 2013]. Cette altération serait plus importante pour les formes oligomériques que les formes monomériques d' α -synucléine. Ainsi le déficit de l'activité de la glucocérébrosidase pourrait être une conséquence de l'accumulation et de l'agrégation de l' α -synucléine [Murphy et coll., 2014].

2.2.2 Dérégulation de la dégradation protéique de la glucocérébrosidase lysosomale

L' α -synucléine peut agir en tant qu'inhibiteur direct de la glucocérébrosidase au niveau de la membrane des vésicules lysosomales [Yap et coll., 2013]. Elle interagit préférentiellement avec les membranes composées de lipides acides [Jo et coll., 2000], et donc celles enrichies en gangliosides [Martinez et coll., 2007 ; Park et coll., 2009 ; Zabrocki et coll., 2008]. Ce trouble lysosomal peut être lié à des mauvaises conformations de l' α -synucléine et perturber l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase.

3. La diminution de l'activité glucocérébrosidase et l'inflammation : un mécanisme précoce majorant les troubles de la maladie ?

La maladie de Gaucher semble être associée à une augmentation de l'incidence des troubles immunologiques tels que des hypergammaglobulinémies, des gammopathies monoclonales, des thrombocytopénies et des anémies hémolytiques auto-immunes [Rosenbaum et coll., 2013]. De plus, les médiateurs inflammatoires associés aux monocytes sont augmentés chez les patients parkinsoniens présentant une mutation du gène *GBA* [Chahine et coll., 2013], ce qui suggère que l'activité de la glucocérébrosidase et l'inflammation participent à la cascade pathologique de la maladie de Parkinson.

3.1 Trouble de l'autophagie

L'altération du flux autophagique observée dans la maladie de Gaucher peut retarder l'élimination des composés de l'autophagosome dont les mitochondries endommagées, engendrant des dommages oxydatifs [Youle et Narendra, 2011 ; Schneider, 2014]. Cette dysfonction mitochondriale semble particulièrement sévère dans les neurones, et pourrait être associée à une neurodégénérescence [Di Malta et coll., 2012].

De plus, les macrophages issus des patients de Gaucher présentent une sécrétion majorée de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β résultant d'une activation de l'inflammasome, qui est un complexe multiprotéique intervenant dans l'inflammation et l'autophagie. Est observée également dans ces macrophages une augmentation de p62, qui est une molécule adaptatrice de l'autophagie [Aflaki et

coll., 2016 ; Boven et coll., 2004 ; Allen et coll., 1997]. Ainsi le traitement par effet chaperone de la glucocérébrosidase facilite la maturation de l'autophagosome et diminue la sécrétion d'IL-1 β , ce qui restaure la capacité autophagique des cellules de Gaucher [Aflaki et coll., 2016].

3.2 Impact des métabolites de la glucocérébrosidase

Les métabolites des sphingolipides ont un rôle crucial dans la voie inflammatoire [Maceyka et Spiegel, 2014]. Ils peuvent influencer les maladies chroniques inflammatoires en inhibant l'absorption intestinale des lipides [Noh et Koo, 2003 et 2004], en altérant le microbiote intestinal [Norris et coll., 2016 ; Sprong et coll., 2001], en activant des récepteurs nucléaires anti-inflammatoires [Mazzei et coll., 2011 ; Parham et coll., 2015] et en neutralisant le LPS [Jozefowski et coll., 2010].

D'une part, certains types de glycosphingolipides peuvent avoir une influence directe sur le processus de différenciation. Notamment, les glycosphingolipides supportent la lignée cellulaire humaine myéloïde HL-60 à se différencier en monocytes/macrophages ou en granulocytes [Nojiri et coll., 1986 et 1988 ; Sandhoff, 1993]. Cependant, dans les modèles *in vivo* et *in vitro* de la maladie de Gaucher, une inflammation est observée même en présence d'une faible accumulation de glucosylcéramides dans les macrophages [Mizukami et coll., 2002 ; Panicker et coll., 2014].

De plus, la maturation des thymocytes en lymphocytes T CD4+ et CD8+ est accompagnée d'une expression d'un type de glycosphingolipides spécifique, indispensable lors de la maturation et de l'activation lymphocytaire [Inokuchi et coll., 2015]. D'autre part, les gangliosides agissent comme des auto-antigènes : les auto-anticorps synthétisés contre l'accumulation de ces gangliosides sont impliqués dans la pathologie des gangliosidoses, et sont potentiellement associés à une mort neuronale sans que le mécanisme soit élucidé [Rigante et coll., 2017].

Enfin, les α -glucosylcéramides sont des ligands endogènes des lymphocytes Natural Killer (NK) pouvant les activer, et les β -glucosylcéramides agissent sur leur activation [Kain et coll., 2014]. Cette population lymphocytaire est activée dans certaines MSL et dans la maladie de Parkinson [Niwa et coll., 2012 ; Zigmond et coll., 2007].

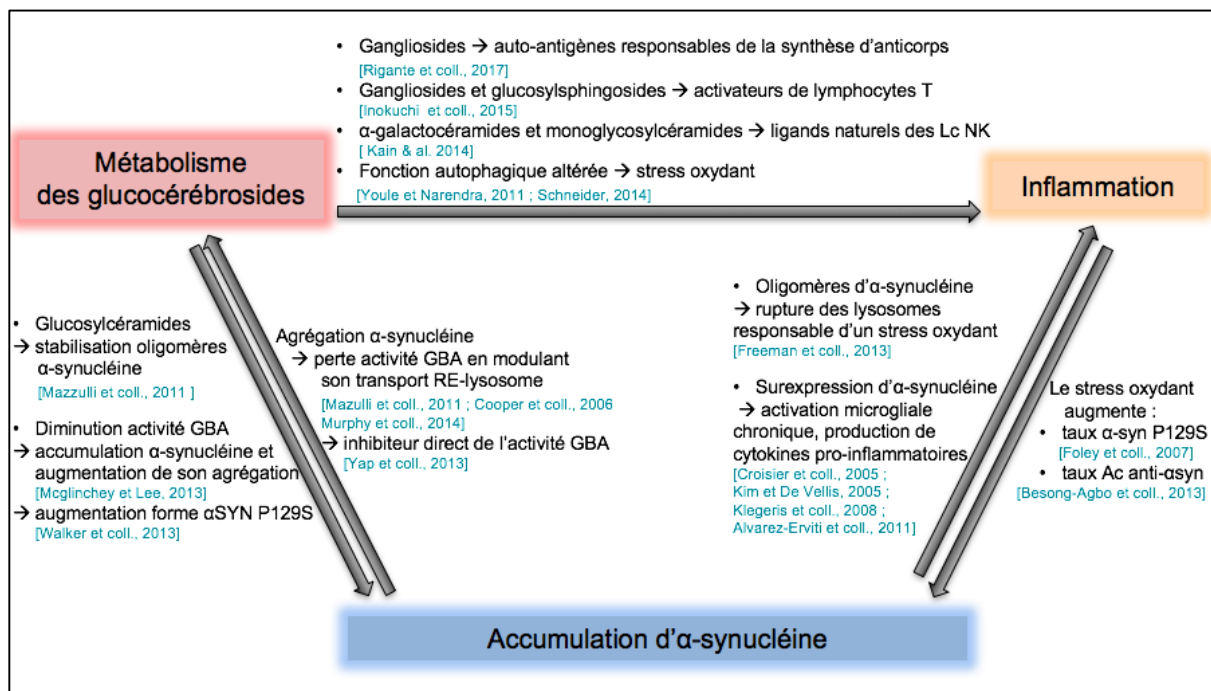


Figure 6 : Représentation du lien suggéré entre l'accumulation de l' α -synucléine, la neuroinflammation et le métabolisme des glucocérebrosides dans la maladie de Parkinson. Réalisée à partir des études *in vivo* et *in vitro* publiées dans la littérature. Lc = lymphocytes, α -syn = α -synucléine, GBA = glucocérebrosidase, RE = réticulum endoplasmique.

OBJECTIF

L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre les liens entre l'activité glucocérébrosidase, l' α -synucléine et la neuroinflammation chez un modèle murin évoquant les stades précoces de la maladie de Parkinson.

Dans un premier temps, l'étude a consisté à parfaire la caractérisation du modèle de souris transgénique Thy1-aSYN basée sur la surexpression pan-neuronale de l' α -synucléine humaine non mutée. Mes travaux ont alors visé à étudier le phénotype moteur et olfactif, le système immunitaire, la composition corporelle et le métabolisme énergétique de ces souris.

Ensuite une modulation pharmacologique de l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase a été réalisée chez ce modèle murin Thy1-aSYN afin d'analyser l'évolution des formes protéiques d' α -synucléine, le recrutement des cellules immunitaires dans le compartiment sanguin et cérébral et les troubles de motricité fine.

Ce projet pourrait permettre de comprendre l'impact de la modulation de la glucocérébrosidase lors d'une surexpression d' α -synucléine *in vivo* afin d'identifier des biomarqueurs potentiels de la maladie de Parkinson, et d'évaluer la conséquence de cette modulation pharmacologique des glucocérébrosides sur les évènements pathologiques associés aux stades précoces de la maladie de Parkinson.

MATERIEL ET METHODES

I Expérimentation animale sur le modèle murin transgénique Thy1-aSYN

1. Le modèle Thy1-aSYN

Les souris Thy1-aSYN ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Californie (Dr Marie-Françoise Chesselet, Université de Los Angeles ; Dr Eliezer Masliah, Université de San Diego, USA). Le projet a fait l'objet d'un agrément de transfert mutuel et d'une autorisation du comité éthique pour l'expérimentation animale (autorisation n°00535.01, CEEA). Ainsi une cohorte de souris Thy1-aSYN sous fond génétique BDF1 a été établie dans notre animalerie Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique (EOPS), à partir de mâles sauvages (wild-type ; WT) et de ces femelles hémizygotés transgéniques fournies par le professeur Marie-Françoise Chesselet (Université de Californie, Los Angeles).

Les souris transgéniques Thy1-aSYN surexpriment une isoforme sauvage humaine du gène *SNCA* inséré sur le chromosome X. L'usage du promoteur murin Thy-1 (thymus cell antigen 1, theta) permet une expression pan-neuronale de la protéine [Rockenstein et coll., 2002]. L' α -synucléine humaine est exprimée dans les neurones dopaminergiques à un niveau d'expression comparable à celui observé dans le cerveau de patients parkinsoniens présentant une triplication du gène *SNCA* [Chesselet et coll., 2012].

Ces souris reproduisent des caractéristiques biochimiques et histopathologiques de la maladie de Parkinson telles que la formation progressive d'inclusions intraneuronales immunoréactives pour l' α -synucléine, une neuroinflammation (activation microgliale dans la substance noire dès 3 mois) et des lésions cellulaires liées au stress oxydant dans la substance noire et l'hippocampe [Watson et coll., 2012 ; Ferganut et coll., 2007 ; Rockenstein et coll., 2002]. A 14 mois, ces souris présentent une perte de dopamine striatale entraînant des troubles moteurs sévères répondant à la L-DOPA [Fleming et coll., 2006]. Ces résultats soulignent que le modèle THY1-aSYN reproduit certaines altérations évoquant les stades précoces de la maladie de Parkinson (figure 7).

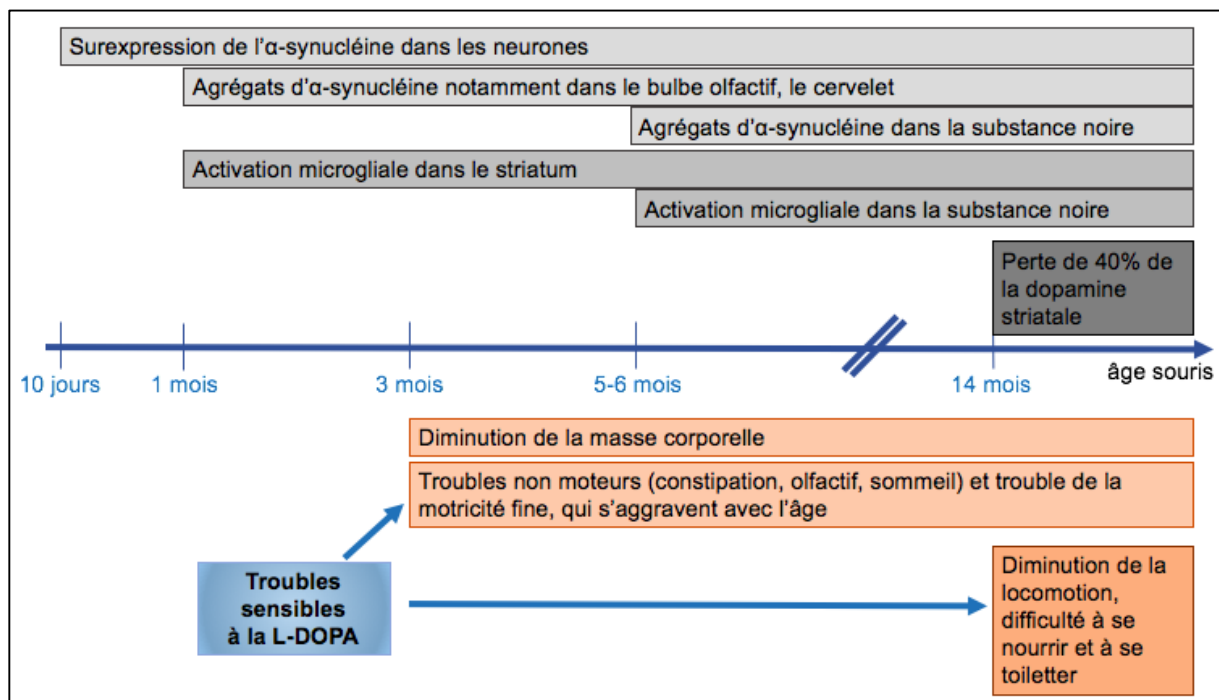


Figure 7 : Schéma récapitulatif des signes cliniques et histopathologiques observés dans le modèle murin Thy1-aSYN en fonction de l'âge, d'après Chesselet et coll., 2012.

2. Hébergement des souris

Les souris mâles ont été hébergées à 4 ou 5 par cage (cages Techniplast GM500) et maintenues dans un cycle jour/nuit avec la lumière éteinte de 20h à 8h. La boisson et la nourriture (RM1A ; 14,8 MJ/kg, Special Diet Services) étaient disponibles à volonté dans les cages.

3. Géotypage des souris

Le géotype des souris a été déterminé par PCR à partir d'échantillons de queues. Tout d'abord, l'ADN génomique a été extrait par un kit d'extraction NucleoSpin (740.952.250, Macherey-Nagel). Puis, l'utilisation du nanodrop a permis de s'assurer de l'efficacité de l'extraction et de doser le taux d'acide nucléique par échantillon. Une PCR a été réalisée à partir de 20ng/μl d'ADN, d'une Taq polymérase ADN recombinante (10342020, Invitrogen) et d'un mélange réactionnel permettant une réaction optimale. Les séquences des primers utilisées sont 5'-GATGATGGCATGCAGCACTGG-3' pour la séquence sens et 5'-GACGGGTGTGACAGCAGTAGC-3' pour la séquence anti-sens. La PCR a été effectuée selon les cycles suivants : 1 min à 95°C, 10 cycles de (1 min 95°C, 1 min à 67°C avec diminution de 1°C par cycle, 1 min à 72°C), 40 cycles de (1 min 95°C, 1

min à 57°C, 1 min à 72°C), et 10 min à 72°C. Puis les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à analyse. Les produits obtenus ont été déposés sur un gel d'agarose 3% et la bande d'ADN de 350 pb correspondant à l' α -synucléine a été recherchée après migration à 130V pendant 35 minutes.

4. Traitement des souris

Des souris mâles âgées de 3 mois ont reçues par voie intra-péritonéale (IP) du conduritol- β -époxyde ou CBE (100 mg/kg/j ; $n_{WT} = 17$, $n_{Thy1-aSYN} = 20$), du miglustat (100 mg/kg/j ; $n_{WT} = 17$, $n_{Thy1-aSYN} = 20$), ou du PBS (10 μ L/g ; $n_{WT} = 19$, $n_{Thy1-aSYN} = 21$) pendant 14 jours consécutifs. Afin de limiter les biais expérimentaux, le traitement a été randomisé et chaque cage comportait des souris de lignée, de génotype et de traitement différents.

Ces deux composés pharmacologiques ont été utilisés afin de moduler le métabolisme des glucocérébrosides chez les souris Thy1-aSYN (figure 8) :

- le conduritol- β -époxyde (CBE), qui inhibe l'activité glucocérébrosidase
- le miglustat (N-butyl-deoxynojirimycin ; Zavesca®), qui est une molécule chaperonne augmentant l'activité glucocérébrosidase et inhibant la glucosylcéramide synthase, son enzyme réverse [Platt, 1994] (www.zavesca.com).

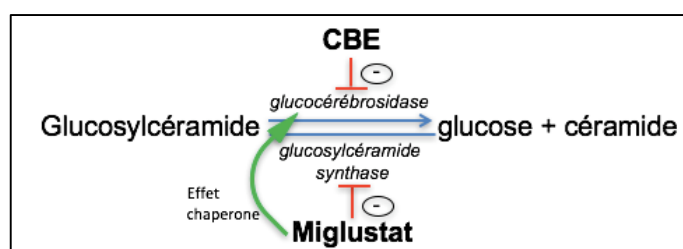


Figure 8 : Composés pharmacologiques utilisés lors de cette étude. L'utilisation du miglustat et du CBE permettent de moduler l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase. CBE = conduritol- β -époxyde.

L'activité de ces composés pharmacologiques a déjà été confirmée *in vitro* dans notre laboratoire et a montré une efficacité *in vivo* dans des modèles murins d'atteintes neurologiques liées à une accumulation de lipides telles que la maladie de Niemann–Pick [Nietupski et coll., 2012] ou de Sandhoff [Jeyakumar et coll., 1999].

Les composés pharmacologiques ont été obtenus dans le cadre d'un partenariat avec l'industrie pharmaceutique Actelion Pharmaceutique. L'utilisation des composés pour ce projet a fait l'objet d'un agrément de transfert mutuel.

5. Analyse de la composition corporelle

Une étude de la composition corporelle a été effectuée sur 19 souris sauvages et 14 souris transgéniques âgées de 3 mois, 12 souris sauvages et 10 souris transgéniques âgées de 6 mois, et 10 souris sauvages et 7 souris transgéniques âgées de 12 mois. Elles ont été anesthésiées par injection IP d'un mélange de kétamine (100mg/kg) et de xylazine (20mg/kg).

Le scanner utilisé est « *in Vivo Micro-CT Scanner for Small Lab Animals* » (LaTheta LCT-100, Hitachi Aloka Medical Ltd, Tokyo, Japon). Celui-ci utilise des rayons X pour visualiser les structures internes du corps et permettre de quantifier la masse maigre, la masse grasse ainsi que la masse et la densité osseuse. Le scanner a permis d'analyser environ 60 coupes optiques à 500 µm d'intervalle par souris, entre les épaules et les pattes postérieures. Les queues ont été exclues de l'analyse.

A l'aide du logiciel Aloka®, différentes analyses ont été effectuées : le taux de masse maigre ainsi que le taux de masse grasse viscérale et sous-cutanée. L'analyse consiste à vérifier la composition corporelle sélectionnée automatiquement par le logiciel. Pour l'analyse des masses grasses, les localisations de la masse grasse sous-cutanée et viscérale ont été vérifiées. Les poumons et les voies respiratoires ont été exclus de l'analyse.

6. Analyse de l'activité ambulatoire, de la consommation de nourriture et de la dépense énergétique en cage métabolique

Seize souris transgéniques et 16 souris sauvages ont été placées individuellement dans des cages LabMaster-Calorimetry System (TSE Systems, Bad Homburg, Allemagne) en polypropylène, de longueur de 20,5 cm, de largeur de 36,5 cm et de hauteur de 14 cm. Afin de diminuer l'impact du stress due à l'arrivée dans un nouvel environnement, les souris ont été placées pendant 3 jours consécutifs dans ces cages et seules les dernières 24 heures ont été recueillies pour l'analyse des données.

Tout d'abord, l'activité ambulatoire a été obtenue par des capteurs optiques (lumière infra-rouge, support ActiMot2) présents dans les 2 dimensions (détecteurs dans l'axe horizontal X et vertical Z). De plus, ces cages permettent la mesure du volume d'oxygène O₂ et de dioxyde de carbone CO₂ libéré sur une période de 15 minutes, 4 fois par heure. Ces résultats ont été moyennés pour déterminer le taux de CO₂ libéré (VCO₂) et le taux d'O₂ consommé (VO₂) en mL/h. Ainsi, à partir des équations suivantes ont été calculés le ratio d'échange respiratoire $RER = VCO_2 / VO_2$ et la dépense énergétique EE (kcal/h) = $((3,815 + 1,232 \times RER) \times VO_2) \times 1000$ [Lusk, 1924]. Le RER est un indicateur du rapport de l'oxydation des acides gras/oxydation des glucides, qui évolue entre 0,7 (oxydation acide gras complète) et 1 (oxydation glucidique complète) [McLean et Tobin, 1987]. Les prises de nourriture et de boisson ont été mesurées toutes les minutes par des détecteurs de précision de 0,01 g et 0,01 mL respectivement (TSE System, GmbH, Allemagne). Le comportement alimentaire, enregistré de manière continue, a permis de mesurer la prise moyenne de nourriture et de boisson pour la phase nocturne et la phase diurne.

7. Tests comportementaux

Les différents tests comportementaux ont été réalisés du moins au plus stressant, afin de limiter le stress des animaux [McIlwain et coll., 2001]. Quatre tests comportementaux ont été développés au sein de l'animalerie EOPS pour évaluer la motricité fine et la fonction olfactive des souris, à partir des protocoles décrits pour ce modèle dans la littérature [Fleming et coll., 2004 et 2008]. Afin de limiter le stress, les souris ont été manipulées régulièrement par la personne réalisant ces tests comportementaux tout au long de leur vie. Au moins 1 heure avant le test, les souris ont été placées dans la pièce où les tests comportementaux ont été réalisés. Puis 30 minutes avant le test, les souris n'avaient plus accès à la nourriture et à la boisson. Lors d'une session, les différents essais ont été alternés entre 4 souris pour laisser un intervalle de temps de récupération d'au moins 2 minutes par souris. De plus, chaque souris a aléatoirement obtenu un numéro de passage et de reconnaissance permettant d'analyser à l'aveugle les vidéos *a posteriori*.

7.1 Tests utilisés pour évaluer la motricité fine

7.1.1 Le test de la traversée de la poutre ou *challenging beam traversal test*

Ce test de performance et de coordination motrice est associé à une poutre en Plexiglas, mesurant 1 mètre de long, et qui est fractionnée en 4 sections de 25 cm de long, de largeurs respectives de 3,5 cm, 2,5 cm, 1,5 cm et de 0,5 cm. Les souris ont tout d'abord été entraînées à traverser la poutre, de la section la plus large à la section la plus étroite pendant 2 jours consécutifs (5 traversées par jour). Lors des premiers essais, la cage contenant les congénères a été présentée tout au long de leur traversée, afin de les encourager à avancer. A la fin de leur première journée d'entraînement, les souris étaient toutes capables de traverser la poutre sans besoin d'aide. Le troisième jour (jour du test), une grille d'un maillage de 1 cm a été posée à 1 cm au-dessus de la poutre afin de complexifier le passage. Les souris ont alors été filmées lors de leur traversée, pendant 5 essais. L'analyse, réalisée *a posteriori* à partir des vidéos, a permis de mesurer le temps de traversée de la poutre (vidéo observée à vitesse ralentie à 0,5x), le nombre de pas et le nombre d'erreurs par traversée (vitesse ralentie à 0,25x). Pour chaque souris et pour chacun de ces paramètres, la moyenne des 5 essais a été calculée. Ce test a été réalisé à l'âge de 3 mois chez 17 souris contrôles et 14 souris Thy1-aSYN, à l'âge de 6 mois chez 18 souris contrôles et 21 souris Thy1-aSYN, et à l'âge de 12 mois chez 15 souris contrôles et 8 souris Thy1-aSYN et. Enfin, à l'âge de 6 mois, ce test a été réalisé chez 19 souris transgéniques et 22 souris Thy1-aSYN traitées par le PBS, 17 souris transgéniques et 20 souris Thy1-aSYN traitées par le miglustat et le CBE.

7.1.2 Le pole test

Ce test a été réalisé chez 14 souris contrôles et 7 souris transgéniques âgées de 12 mois. Le pole test permet d'observer des troubles de la motricité fine liée à une anomalie des ganglions de la base, notamment une déplétion en dopamine au niveau striatal [Matsuura, 1997]. Une tige striée de 1 cm de diamètre et de 50 cm de long est vissée sur une base rectangulaire enfouie dans une cage propre recouverte de litière. Le bois est strié afin d'éviter le glissement des souris. L'animal est posé les pattes avant sur l'extrémité haute de la tige. Le but étant que les souris se retournent en haut du pole pour pouvoir le descendre. Pendant deux jours, les souris ont été entraînées à descendre le pole à 5 reprises. Puis le troisième jour (jour du test), les 5

essais ont été filmés afin de réaliser les analyses *a posteriori*. Le temps maximal de descente était de 120 secondes. En effet, si la souris n'avait pas terminé l'exercice dans ce temps imparti, celle-ci était reposée dans sa cage. Ont été analysés à l'aveugle le temps de retournement de la souris en haut du pole, et le temps total de la descente. Les 5 essais ont ensuite été moyennés.

7.1.3 Test du retrait de l'adhésif

C'est un test de motricité fine en réponse à un stimulus sensoriel. Un adhésif rond de 0,6 cm est placé sur le museau de la souris à l'aide d'une pince. Avec cet adhésif, l'animal est placé seul dans une cage contenant un peu de litière de sa cage habituelle. Si l'adhésif n'est pas retiré dans les 60 secondes, l'expérimentateur doit le lui enlever. Chaque animal a reçu 3 essais. Le temps de retrait de cet adhésif a été quantifié pour chaque essai, et les 3 essais du test ont ensuite été moyennés. Ce test a été réalisé chez 17 souris contrôles et 14 souris transgéniques âgées de 3 mois, et 15 souris contrôles et 8 souris transgéniques âgées de 12 mois. De plus, à l'âge de 6 mois, ont été étudiées 19 souris contrôles et 22 souris transgéniques âgées traitées par PBS, 17 souris transgéniques et 20 souris Thy1-aSYN traitées par le miglustat et le CBE.

7.2 Tests utilisés pour évaluer l'olfaction : le test olfactif habituation/déshabituaton

Le test olfactif a été réalisé chez 13 souris contrôles et 9 souris transgéniques âgées de 3 mois, et chez 16 souris contrôles et 9 souris transgéniques âgées de 12 mois. Des odeurs synthétiques ont été utilisées afin d'éviter un biais potentiel lié à une perte de l'appétit ou une dépression sociale. Le but est d'étudier l'évolution du reniflement des caissettes (caissette d'inclusion 040277, Sigma-aldrich) pendant les 6 premiers essais où la même odeur est présentée, puis lors du 7^{ème} essai où une nouvelle odeur est apposée dans la cage. Les animaux ont été acclimatés à la présence d'une caissette une semaine avant le test. Puis, 24 heures avant le test, les souris ont été individualisées avec une nouvelle caissette dans la cage. Le jour du test, des filtres Whatman, de taille 1,5 par 1,5 cm, ont été imbibés de 5 µL d'arôme alimentaire de banane ou de citron. Aléatoirement, une des deux odeurs a été utilisée en tant que première odeur, par session de 4 souris. Lors de chaque essai, la souris a été placée au pole opposé de la cage où était déposée la caissette. Puis les

30 premières secondes ont été filmées, et le temps de contact avec la cassette a été analysé *a posteriori* pour les 7 essais.

8. Euthanasie

Les souris ont été anesthésiées par injection IP d'un mélange contenant de la kétamine (100 mg/kg) et de la xylazine (20 mg/kg). Puis un prélèvement transcardiaque a été réalisé afin d'obtenir le plasma (par centrifugation à 8000 g pendant 8 minutes à température ambiante). Enfin le cerveau a été récupéré après cette perfusion à l'aide de HBSS 1X.

II Biochimie

1. Extraction de protéines

Une partie d'un hémisphère cérébral broyé dans du RPMI a été utilisée pour l'extraction protéique. Le tissu a été broyé de façon équivolumique dans un tampon RIPA 1X (Pierce) contenant 0,5% de CHAPS (28300, Thermo Scientific) et des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Complete et Phos STOP, Roche). Puis une lyse membranaire a été effectuée à l'aide d'une tige à sonication (20 coups). Après agitation à 4°C pendant une heure, la solution a été centrifugée à 1800 g pendant 20 minutes à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires, et le surnageant a été stocké à -20°C. La quantité de protéines extraite a été déterminée en utilisant un kit BCA (Pierce). Ce kit combine la réaction de Biuret permettant la réduction du cuivre par les protéines. La chélation de ces ions réduits avec l'acide bicinchoninique (BCA) forme un composé pourpre dont l'absorbance est mesurée à 570 nm. La quantification protéique a été réalisée à partir d'une gamme étalon.

2. Western-Blot

Pour chaque puit, 10 µg de protéines ont été déposés. Les échantillons ont été repris dans une solution de Nupage Sample Reducing Agent 10X et de LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen), et ont subi une dénaturation à 95°C pendant 5 à 10 minutes. Sur chaque gel ont été déposés un calibrateur en duplicat (mélange équivolumique de tous les échantillons cérébraux murins utilisés en immuno-

empreinte) et un marqueur de taille (Ladder Page Ruler).

Les protéines ont été séparées sur un gel Bis-Tris 4-12% (NP0323BOX, Life Technologies) à l'aide du tampon MES SDS Running Buffer 20X (Thermo Fisher Scientific) à 200 V pendant 30 minutes. Puis un transfert sur membrane de nitrocellulose ou PVDF (si un anticorps secondaire fluorescent était utilisé) a été effectué à 30 V durant 1h40 dans un tampon de transfert composé de 4,32 g de glycine, 0,9 g de TrisBase, 15 mL de méthanol 5% et 325 mL d'eau ultrapure. En cas d'utilisation de la membrane PVDF, une incubation de 30 secondes dans du méthanol 5% a été nécessaire pour activer ce type de membrane. Après 3 lavages de 10 minutes au TNT 1X (Tris NaCl Tween 20), les membranes ont été saturées par une solution de BSA 5% ou de lait 5% diluée dans du TNT 1X, sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. Puis après deux nouveaux rinçages de 5 minutes, les membranes ont été incubées dans l'anticorps primaire la nuit à 4°C sous agitation. L'anticorps primaire est dilué selon les conditions présentées dans le tableau III.

Le lendemain, après 3 rinçages de 10 minutes, les membranes ont été incubées pendant 1h30 sous agitation à température ambiante avec l'anticorps secondaire HRP anti-souris (7076, cell signaling) ou HRP anti-lapin (A5441, sigma). Si le signal boost était utilisé lors de la dilution de l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire a été également dilué dans une solution de signal boost. De plus, en cas de révélation par fluorescence, des anticorps secondaires fluorescents ont été utilisés (Alexa fluor anti-rabbit 680nm Licor 926-68071, Alexa fluor anti-souris 488nm Life technologies A11-001).

Après 3 nouveaux rinçages, les membranes de nitrocellulose ont été séchées et incubées avec 1 mL d'ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham, Biosciences) pendant 5 minutes, et ont été révélées à l'aide du Amersham TM imager 600. D'autre part, les membranes PVDF, incubées avec les anticorps fluorescents, ont été séchées et révélées à l'aide du Typhoon FLA 9500 GoldSeal (GE Healthcare).

La quantification a été réalisée avec le logiciel ImageJ® software version 1.51w (NIH), et une normalisation a été effectuée à l'aide du calibrateur et de l'actine.

Cette étude d'immunoempreinte a été réalisé chez 19 souris contrôles et 11 souris Thy1aSYN âgées de 6 mois. Pour les souris traitées, les protéines raptor et rictor ont été quantifiés chez dix souris par groupe. De plus, six souris par groupe ont été utilisées afin de quantifier dans le cerveau la forme aSYN P129S, et treize souris par

groupe pour la forme totale α -synucléine. Toutes les expériences ont été réalisées en duplicat ou en triplicat.

Tableau III : Références et conditions des anticorps utilisés par technique d'immuno-empreinte. BSA = serum albumine bovine, SB = signal boost. L'anticorps anti- α -synucléine agrégée reconnaît l'épitope 5G4, observée lors de la conformation en feuillet β de la protéine α -synucléine.

Type d'anticorps	référence	Dilution de l'anticorps primaire	Dilution de l'anticorps secondaire	Taille attendue (kDa)
Ac anti- α syn agrégée	Merck MABN389	1/2000 lait 5%	1/10000 BSA 5%	15 kDa
Ac anti- α syn nitrée	Santa cruz 32279	1/2500 lait 5%	1/10000 BSA 5%	18 kDa
Ac anti- α syn P219S	Cell signaling 23706	1/1000 BSA 5%	1/5000 BSA 5%	15 kDa
Ac anti- α syn totale	BD 610787	1/10000 BSA 5%	1/10000 BSA 5%	18 kDa
Ac anti-IRS 1	Cell signaling 2382	1/1000 BSA 5%	1/5000 BSA 5%	180 kDa
Ac anti-IRS1 P608Y	Merck 09-432	1/2500 BSA 5%	1/10000 BSA 5%	160 kDa
Ac anti-STAT3	Cell signaling 9139	1/2500 SB	1/1000 SB	80 kDa
Ac anti-STAT3 P705Y	Cell signaling 9131	1/1000 SB	1/1000 SB	80 kDa
Ac anti-akt	Cell signaling 9272	1/5000 BSA 5%	1/5000 BSA 5%	60 kDa
Ac anti-akt P473S	Cell signaling 23706	1/2500 SB	1/2500 SB	65 kDa
Ac anti-mTOR	Cell signaling 2972	1/1000 BSA 5%	1/5000 BSA 5%	289 kDa
Ac anti-mTOR P2448S	Cell signaling 2971	1/2500 BSA 5%	1/5000 BSA 5%	289 kDa
Ac anti-raptor	Cell signaling 2280	1/5000 BSA 5%	1/5000 BSA 5%	150 kDa
Ac anti-riCTOR	Cell signaling 2114	1/5000 BSA 5%	1/5000 lait 5%	200 kDa
Ac anti-LC3B	Abcam ab48394	1/2500 BSA 5%	1/5000 BSA 5%	17 kDa
Ac anti-GFAP	Cell signaling 33673	1/5000 lait 5%	1/10000 BSA 5%	50 kDa
Ac anti-GBA	Santa cruz 365745	1/5000 BSA 5%	1/10000 BSA 5%	57 kDa
Ac anti-actine	sigma A5441	1/10000 lait 5%	1/10000 BSA 5%	42 kDa

3. ELISA

Tout d'abord, les dosages plasmatiques d'insuline et de leptine ont été réalisés à partir d'échantillons sanguins recueillis dans des tubes héparinés, et centrifugés à 425 g pendant 10 min à 4°C. Seize souris contrôles et onze souris transgéniques âgées de 6 mois ont été examinées en duplicat.

L'insuline a été dosée à partir du plasma à l'aide du kit Mercodia ultrasensible Mouse Insulin ELISA (Mercodia, Uppsala, Suisse). Le principe de ce kit est un dosage immunologique à double site en phase solide. En phase d'incubation, l'insuline

présente dans l'échantillon réagit avec les deux anticorps (Ac) anti-insuline : 1 Ac conjugué à la peroxydase et 1 Ac fixé au puit de microtitration. Un rinçage simple élimine les Ac non liés. Le conjugué est détecté par réaction avec la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). La réaction est arrêtée en ajoutant de l'acide. Puis la concentration est obtenue par dosage spectrophotométrique.

La leptine est dosée à l'aide du kit quantikine ELISA (MOB00, R&D Systems, Minneapolis, MN). Un Ac polyclonal spécifique de la leptine murine, fixé sur une microplaque, va fixer la leptine présente dans l'échantillon. Après 5 lavages, un Ac monoclonal anti-leptine couplé à une enzyme est ajouté dans les puits. Cinq lavages sont à nouveau effectués et une solution substrat de l'Ac couplé à l'enzyme est ajoutée dans chaque puit. Il apparaît après réaction une coloration bleue, qui devient jaune après ajout de la solution stop. L'intensité mesurée est proportionnelle à la quantité de leptine dans l'échantillon.

Puis l' α -synucléine humaine a été quantifiée dans le sang et le cerveau par test ELISA selon le protocole du fabricant (Human α -synuclein kit, K151TGD-2, MSD MULTI-ARRAY Assay System), à partir de plasma dilué au 1/30 et de l'échantillon cérébral dilué au 1/40000. La quantification de l' α -synucléine a été normalisée au volume plasmatique et à la quantité protéique respectivement pour les échantillons sanguins et cérébraux.

Afin d'analyser l'hémolyse de nos échantillons plasmatiques, un dosage de l'hémoglobine a été réalisé sur les plasmas dilués au 1/4000 dans du PBS 1X à pH 7 chez ces mêmes échantillons. En phase d'incubation, l'hémoglobine agrégée réagit avec les deux Ac : 1 Ac fixé à la plaque et 1 Ac conjugué à la biotine. Trois rinçages éliminent les Ac non liés. La peroxydase est ensuite ajoutée dans chaque puit. Suite à 5 lavages, le conjugué est détecté par réaction avec la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). La réaction est arrêtée en ajoutant de l'acide sulfurique, puis la concentration d'hémoglobine a été dosée par méthode spectrophotométrique. L' α -synucléine humaine a été quantifiée dans le sang et le cerveau de 19 souris transgéniques traitées par PBS, miglustat et CBE.

4. FRET

A partir de l'extraction protéique décrit précédemment, un dépôt de 1,5 μ g a été déposé dans chaque puit. Cette forme agrégée est détectée par 2 Ac anti- α -synucléine humaine : 1 Ac donneur Tb-cryptate et 1 Ac accepteur. En cas

d'agrégation protéique, ces 2 Ac sont suffisamment proches pour interagir : l'Ac donneur excité à 340 nm va libérer une énergie (620 nm) pouvant être absorbée par cet Ac accepteur. Ainsi l'Ac accepteur va émettre à une longueur d'onde de 665 nm. Après une incubation de 20 heures, le rapport 665/620 permet de quantifier cette forme agrégée. Pour chaque traitement, deux souris contrôles et huit souris transgéniques ont été utilisées pour cette manipulation, qui a été réalisée en duplicat.

5. Mesure de l'activité glucocérebrosidase

L'activité enzymatique cérébrale de la glucocérebrosidase a été mesurée par essai fluorimétrique, à pH 5, en utilisant le substrat 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside [Trapero et coll., 2012]. Une mesure sur les mêmes échantillons a été réalisée en ajoutant du condritol- β -epoxyde (inhibiteur de la glucocérebrosidase de type 1). Ainsi l'activité de la glucocérebrosidase de type 1 a été obtenu en soustrayant l'activité enzymatique totale par l'activité enzymatique obtenue sans celle de la glucocérebrosidase de type 1. L'activité a été quantifiée en triplicat pour chaque échantillon étudié (PBS : $n_{WT}=19$; $n_{THY1aSYN}=22$. CBE : $n_{WT}=17$; $n_{THY1aSYN}=20$. MIG : $n_{WT}=17$; $n_{THY1aSYN}=20$).

6. Mesure de la glycémie

La glycémie a été mesurée immédiatement après la mise à mort sur sang total à l'aide d'un lecteur de glycémie OneTouch Vita (Lifescan), chez 19 souris contrôles et 11 souris transgéniques âgées de 6 mois.

III Cytométrie en flux

L'utilisation de la cytométrie en flux a permis de détecter et de quantifier les lymphocytes B, T CD4+, T CD8+, T régulateurs, natural killer (NK), les monocytes et macrophages dans le sang et le cerveau des souris, à l'aide des anticorps et isotopes respectifs anti-CD45, CD3, CD4, CD8a, CD25, FOX P3, CD335 (NKp46), CD11b et CD19 (figure 9). Le protocole a été mis au point à partir de protocole de cytométrie issu de la littérature [Pino et Cardona, 2011].

L'étude a été réalisée au niveau périphérique à partir de 100 μ L de sang total prélevé dans un tube hépariné, et au niveau central à partir d'un hémisphère cérébral

recupéré dans 2 mL de RPMI sans rouge de phénol et broyé dans un homogénéiseur doux (dounce grinder 432-1272, VWR) contenant 3 mL de RPMI. Cette solution cérébrale a ensuite été filtrée à travers un filtre de 40 µm, et le volume obtenu a été complété avec du RPMI pour atteindre 7 mL. La réalisation d'un gradient de Percoll a permis de récupérer les cellules immunitaires : 3 mL de Percoll (170891-01, GE Healthcare Life Sciences) a été ajouté à la solution précédente. Ces 10 mL de solution ont été déposés sur 2 mL de solution de SIP à 70%, dilué dans du HBSS 1X. La solution a été centrifugée pendant 30 min à 500 g, à 18°C avec une force d'accélération de 5 et une force de freinage de 0. Après avoir éliminer les débris, 2 à 3 mL de l'interphase de Percoll 30-70% ont été récupérés dans 8 mL de HBSS 1X. Suite à une centrifugation de 7 min à 500g à 18°C, le culot a été resuspendu dans 1 mL de PBS 1X. Environ 150000 cellules/mL ont été distribuées par aliquot. Si possible, trois aliquots par échantillon sanguin et cérébral ont été effectués, afin d'avoir un échantillon contrôle, un échantillon contenant les isotypes, et un autre contenant les anticorps.

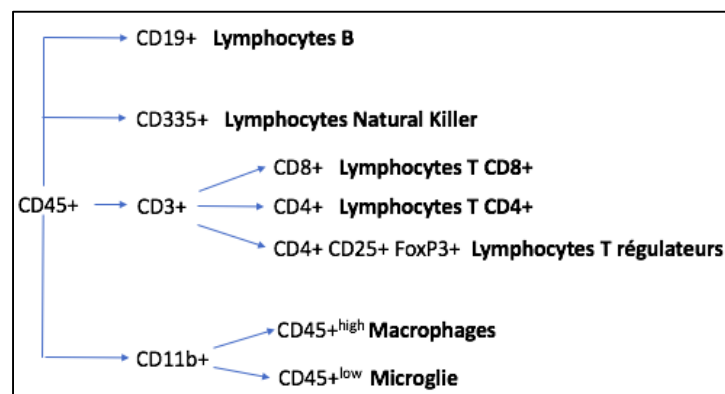


Figure 9 : Représentation des types cellulaires étudiés en fonction des anticorps utilisés lors de l'étude par cytométrie en flux.

La première étape consistait à bloquer les sites aspécifiques. Ainsi 4 et 8 µg de FC Block (Mouse BD Fc Block purified rat anti-souris CD16/CD32, 553142) ont été ajoutés respectivement dans chaque échantillon sanguin et cérébral. Ces échantillons vortexés sont incubés 5 à 10 minutes à température ambiante.

Puis, les anticorps ou isotypes associés sont ajoutés dans chaque échantillon selon le tableau IV. Néanmoins, la population cellulaire CD45+ étant en faible quantité, l'anticorps anti-CD45+ a été utilisé également dans les échantillons contenant les isotypes, afin d'obtenir le bruit de fond à partir de la population CD45+.

Suite à cette incubation de 40 min à température ambiante, les globules rouges ont été lysés par ajout de 2 mL d'une solution de tampon de lyse de globules rouges

(Lysis Buffer 555899, BD). Chaque échantillon a été vortexé puis incubé pendant 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Puis une nouvelle centrifugation (200 g, 5 min à 20°C) a permis de récupérer un culot que l'on a resuspendu dans 50 µL de PBS 1X. Pour les échantillons sanguins, une seconde étape de lyse a été réalisée : les échantillons ont été incubés après ajout de 0,5 mL de tampon de lyse, puis ont été repris dans 50 µL de PBS 1X après une centrifugation de 5 min à 200 g.

L'anticorps FOXP3 étant intracellulaire, des étapes de fixation et de perméabilisation ont été nécessaires. Ces tubes quantifiant FOXP3 ont été incubés à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 20 minutes après ajout de 1 mL du tampon fixateur/perméabilisant 1X (FOXP3 Fix/Perm Buffer 421401, Biolegend). Après une centrifugation de 5 min à 200 g, le surnageant a été de nouveau aspiré et le culot a été resuspendu avec 100 µL de PBS 1X.

Tableau IV : Références et conditions des anticorps utilisés lors de la cytométrie en flux.

Anticorps ou isotype utilisé	Référence	Quantité dans 100 µL d'échantillon
Ac anti-CD45+	Biolegend APC/Cy7 anti-mouse CD45 ; 103116	0,35 µg
Ac anti-CD19+	Biolegend BV510 anti-mouse CD19 ; 115546	0,125 µg
Isotype anti-CD19+	Biolegend BV 510 rat IgG2a, k isotype Ctrl ; 400553	0,125 µg
Ac anti-CD335+ (NKp46)	Biolegend PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD335 ; 137610	2 µg
Isotype anti-CD335+ (NKp46)	Biolegend PerCP/Cy5.5 rat IgG2a, k isotype Ctrl ; 400532	2 µg
Ac anti-CD3+	Biolegend BV421 anti-mouse CD3 100228	1 µg
Isotype anti-CD3+	Biolegend BV421 rat IgG2b, k isotype Ctrl ; 400655	1 µg
Ac anti-CD8+	Biolegend Alexa Fluor 647 anti-mouse CD8a ; 100724	0,5 µg
Isotype anti-CD8+	Biolegend Alexa Fluor 647 rat IgG2a, k isotype Ctrl ; 400526	0,5 µg
Ac anti-CD4+	Biolegend BV 650 anti-mouse CD4, 100555	0,5 µg
Isotype anti-CD4+	Biolegend BV 650 rat IgG2a, k isotype Ctrl ; 400541	0,5 µg
Ac anti-CD25+	Biolegend PE anti-mouse CD25 101904	1 µg
Isotype anti-CD25+	Biolegend PE rat IgG2b, k isotype Ctrl ; 400608	1 µg
Ac anti-CD11b+	Biolegend PE/Cy7 anti-mouse CD11b, 101216	0,5 µg
Isotype anti-CD11b+	Biolegend PE/Cy7 rat IgG2b, k isotype Ctrl ; 400618	0,5 µg

Après centrifugation (5 min à 200 g), le culot a été resuspendu avec 100 µL de solution contenant du PBS 1X, 1% de BSA et 0,5% de saponine diluée au 10X, puis a été incubé à température ambiante pendant 15 minutes.

Une incubation de 15 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante a été effectuée après ajout de 4 ou 8 µg de solution de blocage (respectivement pour les échantillons périphériques et centraux). Dans les tubes « isotypes » et « anticorps » ont été respectivement ajoutés 3 µg d'isotype anti-FOXP3 (Alexa fluor 488 mouse IgG1, k isotype Ctrl, 400134, Biolegend), et 2 µg d'anticorps anti-FOXP3 (Alexa fluor 488 anti-mouse FOXP3, 320012, Biolegend). Puis 1 mL de la solution contenant de la BSA et de la saponine a été ajouté. Enfin après une centrifugation de 5 min à 200 g, le surnageant a été aspiré et le culot a été resuspendu dans 0,4 mL de PBS 1X, afin d'être lu par l'analyseur cellulaire BD LSRFortessa X-20.

Cette étude a été réalisée dans le sang de souris âgées de 3 mois (17 contrôles et 13 transgéniques), 6 mois (18 souris/groupe) et 12 mois (7 souris/groupe), et également dans le cerveau de souris âgées de 3 mois (14 contrôles et 13 transgéniques), 6 mois (14 souris/groupe) et 12 mois (10 souris contrôles et 9 transgéniques). Les effectifs utilisés en cytométrie en flux dans le sang pour les souris traitées sont les suivants : 17 souris contrôles et 13 souris transgéniques traitées par PBS, 17 souris contrôles et 14 souris transgéniques traitées par le CBE, et 16 souris contrôles et 14 souris transgéniques traitées par le miglustat. Les effectifs utilisés pour l'étude cérébrale sont les suivants : 15 souris contrôles et 13 souris transgéniques traitées par PBS, 15 souris contrôles et 12 souris transgéniques traitées par le CBE, et 13 souris contrôles et 11 souris transgéniques traitées par le miglustat.

IV Spectrométrie de masse et chromatographie en couche mince

D'une part, pour confirmer le passage du miglustat à travers la BHE, une méthode de détection et de quantification par CLHP-SM sur des échantillons de tissus cérébraux murins a été développée avec l'aide d'Hélène Carrié, alors ATER au laboratoire, et en collaboration avec le PSM-GRITA sous la responsabilité du Professeur Jean-François Goossens. Pour mettre au point cette méthode nous nous sommes appuyés sur les travaux réalisés par Guitton et collaborateurs qui ont quantifié le miglustat dans d'autres liquides biologiques. Tout d'abord, une méthode

d'extraction du miglustat de tissus cérébraux a été établie. Pour cela, différents essais ont été réalisés sur des échantillons cérébraux test traités au miglustat afin de déterminer les conditions optimales d'extraction. Le tissu cérébral choisi a été placé dans un eppendorf puis une solution d'extraction, composée d'un mélange méthanol/acétonitrile (25/75, 20 μ L/mg de tissu), a été ajoutée. Un broyage sur glace a alors été effectué à l'aide d'un mini vortex pendant 2 min suivi d'une centrifugation pendant 30 sec à l'aide d'une mini-centrifugeuse. Le surnageant a été récupéré et le culot repris dans le même volume de solution d'extraction pour une deuxième extraction identique. Les 2 surnageants obtenus ont ensuite été regroupés et centrifugés 15 minutes à 10000 g à 4°C. Le surnageant final est récupéré, évaporé sous flux d'azote à 45°C, puis repris dans 50 μ L d'acétonitrile et centrifugés pendant 7 min à 4 000 g. Le surnageant limpide ainsi obtenu est placé dans un vial CLHP en vue de son analyse. Les analyses ont été effectuées à l'aide du Surveyor HPLC, équipé d'une pompe quaternaire, un dégazeur et un passeur d'échantillons, couplé à un spectromètre de type Triple Stage Quadrupole Vantage (ThermoScientific®, San Jose, Etats-Unis). Les données sortantes ont été analysées à l'aide du logiciel Xcalibur®. Pour chaque échantillon, 10 μ L ont été prélevés puis injectés sur une colonne de type HILIC. La séparation sur colonne a été réalisée en mode isocratique en utilisant une phase mobile composée d'eau/acétonitrile/tampon acétate 100mM, pH 5 (75/10/15, vol/vol/vol) à température ambiante avec un débit de 230 μ L/min sur une durée de 6 minutes. La détection des espèces ionisées a été faite en mode positif en utilisant les paramètres suivants : tension du capillaire 45V, température de vaporisation 150°C, température du capillaire 250°C, gaz de nébulisation 30 PSI (pound per square inch). Les spectres de masse totaux ont été enregistrés sur une gamme entre 100 et 900 m/z. Le détecteur permettant une analyse des composés ionisés en mode « *Single Ion Monitoring* » (SIM), une détection par ce mode a été effectuée pour notre molécule d'intérêt, le miglustat. Cette détection a été réalisée sur une fenêtre de masse réduite correspondant au rapport de masse $m/z = [M+H]^+ \pm 0,5$ du miglustat, soit une fenêtre de détection comprise entre 219,7 et 220,7 m/z. Afin de détecter le miglustat, des souris BDF1 ont été traitées pendant 7 jours consécutifs par du miglustat par voie intra-péritonéale à la dose de 100 Mg/kg/ 10 mL.

Puis, des échantillons de cortex somatomoteur ont été utilisés (n = 4 à 5 par groupe) pour quantifier les niveaux de glucocérobrosides et de céramides dans le cerveau des souris par chromatographie CLHP-SM. Ces dosages ont fait l'objet d'une

collaboration avec le département de pathologies cellulaires et moléculaires (G130) de l'Université de Heibelberg avec l'équipe du Dr Roger Sandhoff. Enfin, d'autres échantillons de cortex somatomoteur (n = 4 à 5 par groupe) ont été utilisés afin de quantifier par chromatographie couche mince les sphingolipides, en collaboration avec l'équipe du Dr Viola Nordström (université de Heibelberg, Allemagne), selon le protocole de Nordstrom et coll., 2013.

V Statistiques

Les résultats quantitatifs sont présentés par la médiane et les quartiles [Q1 ; Q3], et les résultats qualitatifs en ratio et pourcentage.

Concernant les tests statistiques, les tests de Mann et Whitney et de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour étudier les différences entre deux ou plus de deux groupes présentant une variable continue. Les résultats sont statistiquement significatifs si la plus-value est inférieure à 0,05.

Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism® version 7.

RESULTATS

I CARACTERISATION DU MODELE

1. Troubles moteurs et non moteurs chez le modèle murin Thy1-aSYN

1.1 *Troubles de la motricité fine dès l'âge de 3 mois*

Le pole test, réalisée à l'âge de 12 mois, montre une augmentation significative du temps de retournement chez les souris transgéniques par rapport aux souris contrôles (120 s [91,7 ; 120] vs 2,324 s [1,754 ; 12,41]) (figure 10B). Le temps de descente du pole est similaire entre ces deux groupes, avec une variabilité très importante dans le groupe transgénique (4,875 s [3,329 ; 50,72] vs 4,633 s [3,171 ; 5,272]) (figure 10C).

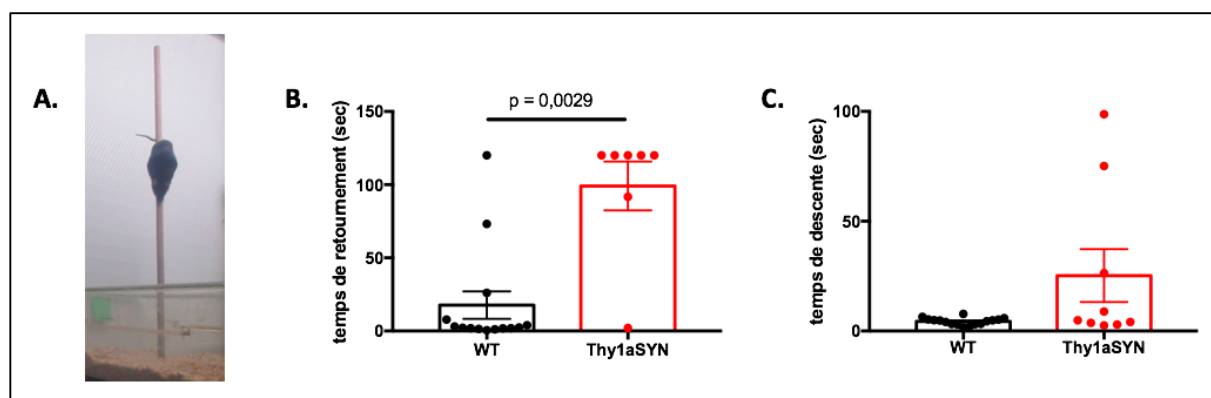


Figure 10 : Le pole test réalisé chez les souris Thy1-aSYN et sauvages âgées de 12 mois. (A) Descente du pole d'une souris sauvage. (B) Les souris transgéniques prennent plus de temps à se retourner que les souris sauvages, malgré un temps de descente non significativement différent (C). Test de Mann-Whitney ; $n_{WT} = 14$; $n_{Thy1-aSyn} = 7$.

Le test de challenge de la poutre analysant un trouble de motricité fine ne montre pas de différence significative entre les souris Thy1a-SYN et contrôles sur le temps de traversée et le nombre de pas à 3, 6 et 12 mois (figure 11C). Cependant, le nombre d'erreurs par pas est plus important chez les souris transgéniques par rapport aux contrôles dès l'âge de 3 mois (à 3 mois : 0,8369 [0,7298 ; 1,101] vs 0,3974 [0,2959 ; 0,621] ; à 6 mois : 0,7792 [0, 6388 ; 0,992] vs 0,3162 [0,2638 ; 0,4541] ; et à 12 mois : 1,345 [0,8872 ; 1,508] vs 0,793 [0,4946 ; 1,001]).

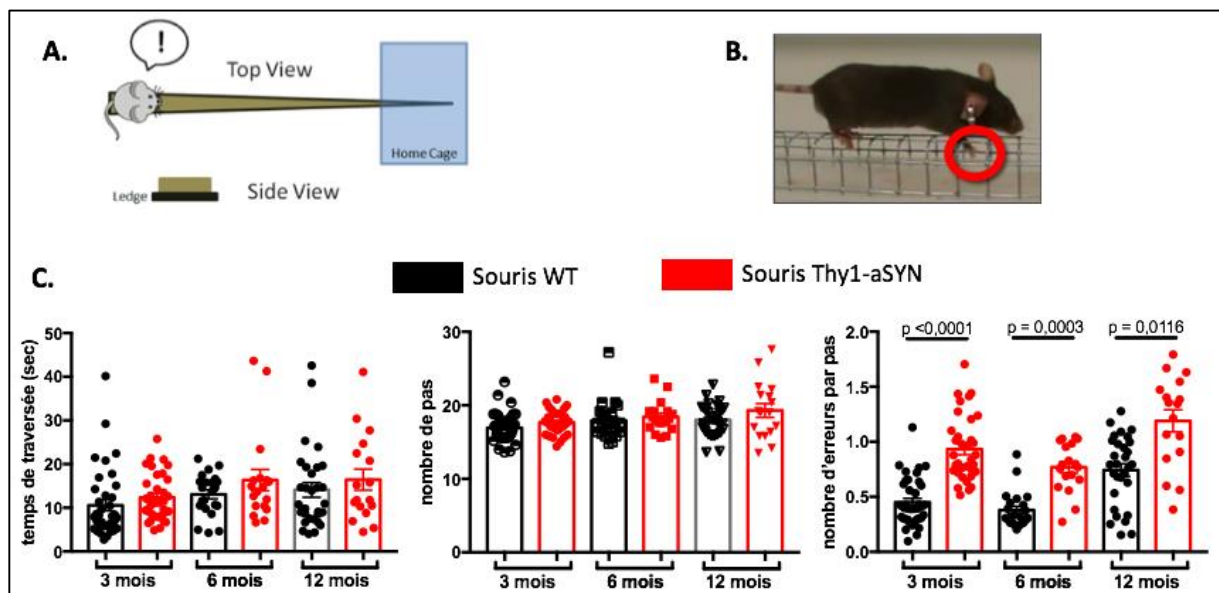


Figure 11 : Test de challenge de la poutre chez les souris Thy1-aSYN et sauvages âgées de 3, 6 et 12 mois. (A) Représentation du schéma du test moteur. (B) Représentation d'une erreur observée lors de l'analyse du test. (C) Les souris transgéniques présentent un nombre d'erreurs par pas majoré dès l'âge de 3 mois. Test de Kruskal-Wallis. Effectifs à 3 mois : $n_{WT} = 17$; $n_{Thy1-aSyn} = 4$, à 6 mois : $n_{WT} = 18$; $n_{Thy1-aSyn} = 21$, et à 12 mois ; $n_{WT} = 15$; $n_{Thy1-aSyn} = 8$.

Enfin, le test du retrait de l'adhésif a été réalisé chez les deux cohortes de souris âgées de 3, 6 et 12 mois. Le temps de retrait de cet adhésif est significativement plus élevé chez les souris transgéniques à 3 mois (6,025 s [4,335 ; 8,907] vs 4,21 s [3,409 ; 5,078]) et à 12 mois (21,59 s [9,902 ; 32,24] vs 5,285 s [2,902 ; 7,822]) par rapport aux souris contrôles. Néanmoins, aucune différence significative n'est observée à l'âge de 6 mois (4,422 s [3,668 ; 6,507] vs 4,65 s [3,434 ; 5,705]) (figure 12B).

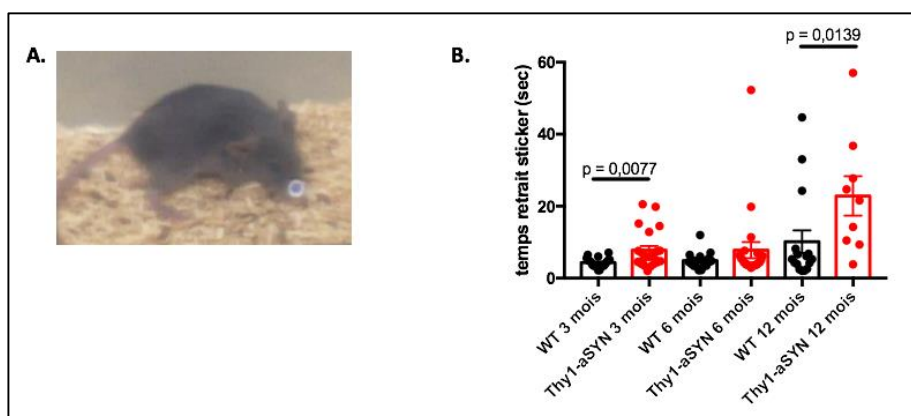


Figure 12 : Test du retrait de l'adhésif, réalisé chez des souris Thy1-aSYN et sauvages âgées de 3, 6 et 12 mois. (A) Représentation du test réalisé. (B) Le temps de retrait de l'adhésif est significativement plus important chez les souris transgéniques âgées de 3 et 12 mois par rapport à leurs contrôles respectifs. Test de Kruskal-Wallis. Effectifs à 3 mois : $n_{WT} = 17$; $n_{Thy1-aSyn} = 4$, à 6 mois : $n_{WT} = 18$; $n_{Thy1-aSyn} = 21$, et à 12 mois ; $n_{WT} = 15$; $n_{Thy1-aSyn} = 8$.

1.2 Trouble olfactif dès l'âge de 3 mois

Le trouble olfactif a été étudié par le test habituation/déshabitude.

Lors des deux premiers essais, les souris transgéniques reniflent moins longtemps la caissette que les souris contrôles à l'âge de 3 mois (essai 1 : 0 s [0 ; 6,96] vs 2,06 s [0 ; 3,56] et essai 2 : 0 s [0 ; 6,96] vs 2,06 s [0 ; 3,56]) et à l'âge de 12 mois (essai 1 : 0 s [0 ; 2,12] vs 3,24 s [1 ; 6,84] et essai 2 : 0 s [0 ; 0] vs 0,14 s [0,14 ; 7,5]). Lorsque la nouvelle odeur est présentée au septième essai, les souris transgéniques sentent significativement moins la caissette que les souris contrôles uniquement à l'âge de 12 mois (3,52 sec [0 ; 6,1] vs 6,26 sec [4,68 ; 9,16]). Cependant, les souris contrôles reniflent davantage les caissettes des essais 6 et 7, à tout âge par rapport aux souris transgéniques (à l'âge de 3 mois : 0 sec [0 ; 0,76] vs 0 sec [3,7 ; 8,34] et à l'âge de 12 mois : 0,92 sec [0 ; 4,11] vs 6,26 sec [4,68 ; 9,16]) (figure 13).

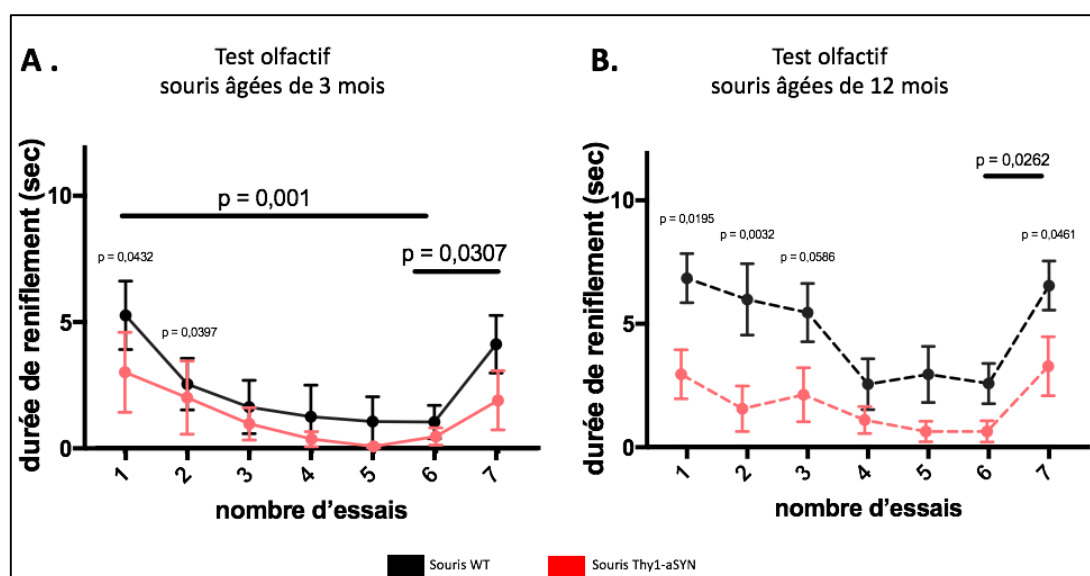


Figure 13 : Test olfactif habituation/déshabitude réalisé chez des souris Thy1-aSYN et sauvages âgées de 3 et 12 mois. Les souris transgéniques reniflent moins que les souris sauvages lors des deux premiers essais à l'âge de 3 (A) et 12 (B) mois. Ces souris Thy1-aSYN reniflent significativement moins la caissette du septième essai que les souris sauvages à l'âge de 12 mois. De plus, la durée de reniflement lors du changement d'odeur est augmentée que chez les souris sauvages âgées de 3 et 12 mois. Test de Mann-Whitney. Effectifs à 3 mois : $n_{WT} = 13$; $n_{Thy1-aSyn} = 9$, et à 12 mois ; $n_{WT} = 16$; $n_{Thy1-aSyn} = 9$.

1.3 Masse corporelle moindre dès 3 mois, perdurant avec le temps

Des souris Thy1-aSYN et contrôles ont été pesées au sevrage (à 21 jours) et à l'âge de 2, 3, 6, 9 et 12 mois. Indépendamment du génotype, les deux cohortes de souris gagnent du poids avec l'âge (Kruskal Wallis, $p < 0,0001$ pour les deux

génotypes) (figure 14). Cependant, le poids des souris transgéniques est significativement inférieur à celui des souris contrôles dès l'âge de 3 mois (test de Mann et Whitney, $27,25 \pm 0,92$ vs $31,31 \pm 0,94$ g ; $p < 0,001$).

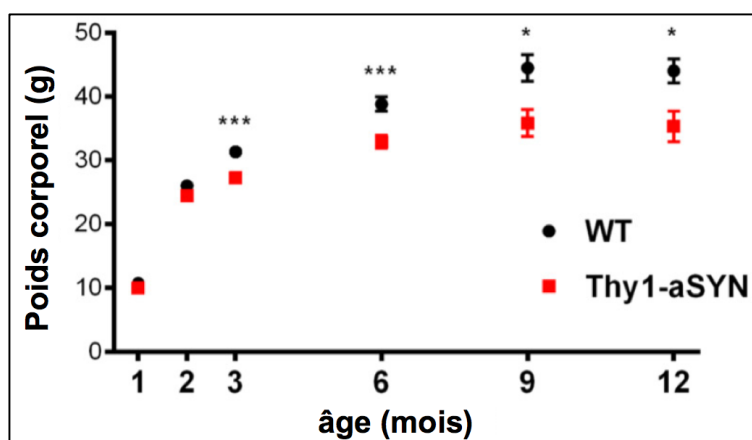


Figure 14 : Masse corporelle en fonction de l'âge des souris Thy1-aSYN et WT. Les souris transgéniques sont plus maigres dès l'âge de 3 mois. Cette tendance perdure dans le temps. Test de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis. Effectifs à 1 et 2 mois : 17 / groupe, à 3 mois : $n_{WT} = 27$; $n_{Thy1-aSyn} = 25$, à 6 mois : $n_{WT} = 33$; $n_{Thy1-aSyn} = 29$, à 9 mois : $n_{WT} = 10$; $n_{Thy1-aSyn} = 9$, et à 12 mois : $n_{WT} = 10$; $n_{Thy1-aSyn} = 7$.

2. Troubles métaboliques du modèle murin Thy1-aSYN

2.1 Masse grasse plus faible à l'âge de 6 mois

Suite à la variation de la masse corporelle, la composition corporelle des souris Thy1-aSYN et WT a été analysée à l'aide du CT-SCAN. Les teneurs en masse maigre, masse grasse viscérale et sous-cutanée ont été mesurées. Les figures 15A représentent des coupes issues de l'analyse d'une souris contrôle et d'une souris transgénique. Ces analyses révèlent aucune différence significative de masse maigre entre les souris Thy1-aSYN et WT dès l'âge de 3 mois (à 3 mois : 15,84 g [15,3 ; 18,88] vs 15,95 g [15,19 ; 17,44] ; à 6 mois : 17,11 g [16,96 ; 18,51] vs 19 g [17,84 ; 20,7] et à 12 mois : 17,74 g [16,64 ; 18,54] vs 19,72 g [18,22 ; 21,58]). Cependant, une augmentation significative de la masse maigre avec l'âge est observée chez les souris sauvages à l'âge de 6 mois par rapport à l'âge de 3 mois (19 g [17,84 ; 20,7] vs 15,85 g [15,19 ; 17,44]) (figure 15B).

De plus, les souris Thy1-aSYN âgées de 6 mois ont significativement moins de masse grasse viscérale (1,31 g [0,08046 ; 1,716] vs 3,965 g [2,037 ; 5,415]), et de masse grasse sous-cutanée (1,421 g [1,077 ; 1,86] vs 3,494 g [2,028 ; 7,7275]) que les souris sauvages (figure 15D).

Comme pour la masse maigre chez les souris sauvages, on observe avec l'âge une augmentation de la masse grasse viscérale (à 6 mois : 3,965 g [2,037; 5,415]) vs à 3 mois : 1,365 g [0,8308 ; 2,861]) et de la masse grasse sous-cutanée (à 12 mois : 5,346 g [4,024; 6,482]) vs à 3 mois : 2 g [1,027 ; 3,989]).

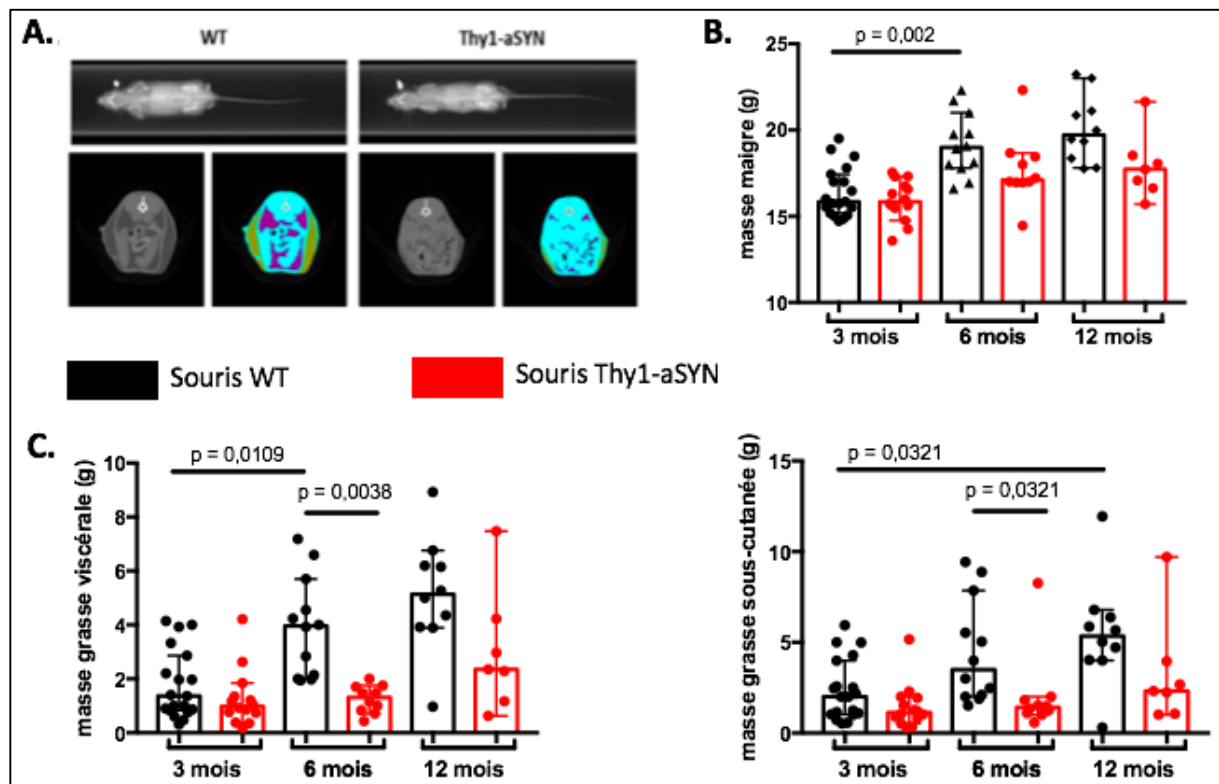


Figure 15 : Composition de la masse corporelle des souris Thy1-aSYN et WT à l'âge de 3, 6 et 12 mois. (A) Image obtenue lors de l'analyse de la masse corporelle chez une souris sauvage (WT) et transgénique (Thy1-aSYN) âgées de 6 mois au CT-Scan, où sont représentés la masse maigre (bleu), la masse grasse sous-cutanée (jaune), viscérale (violet) et l'os (blanc). (B) La teneur en masse maigre est similaire entre les souris sauvages et Thy1-aSYN, mais les souris sauvages ont significativement plus de masse maigre à l'âge de 6 mois qu'à l'âge de 3 mois. (C) Les souris transgéniques ont significativement moins de masse grasse viscérale et sous-cutanée que les souris sauvages à 6 mois. De plus, les souris sauvages ont un gain de masse viscérale (à 6 mois) et sous-cutanée (à 12 mois) par rapport à l'âge de 3 mois. Test de Kruskal-Wallis. Effectifs à 3 mois : $n_{WT} = 19$; $n_{Thy1-aSyn} = 14$, à 6 mois : $n_{WT} = 12$; $n_{Thy1-aSyn} = 10$, et à 12 mois : $n_{WT} = 10$; $n_{Thy1-aSyn} = 7$.

2.2 Consommation de boisson et de nourriture moins importante

Afin de mieux comprendre les causes de la diminution du poids corporel et de la masse grasse chez les souris Thy1-aSYN âgées de 6 mois, nous avons analysé leur prise alimentaire dans des cages métaboliques en phase diurne et nocturne. L'analyse montre que, en phase nocturne, les souris transgéniques présentent une diminution significative de la prise de boisson (1,37 mL [0,07 ; 1,8] vs 2,85 mL [1,703

; 2,67]) (figure 16A) et de la prise alimentaire par rapport aux souris contrôles (2,13 g [1,25 ; 2,77] vs 2,79 g [2,155 ; 3,75]) (figure 16B). Le cycle jour/nuit a un impact sur la prise alimentaire : la prise alimentaire en phase nocturne est plus importante pour les deux cohortes de souris (souris WT : 2,79 g [2,155 ; 3,75] vs 0,76 g [0,415 ; 1,685] ; souris Thy1-aSYN : 2,13 g [1,25 ; 2,77] vs 0,91 g [0,25 ; 1,123]). De plus, la consommation de boisson est significativement augmentée pendant la phase nocturne uniquement chez les souris contrôles (2,85 mL [1,703 ; 2,67] vs 0,325 mL [0,0525 ; 0,565]).

Associée à cette diminution de la prise alimentaire, les souris transgéniques mangent significativement en plus petite quantité en phase nocturne (0,1493 g [0,13 ; 0,2151] vs 0,2613 g [0,1523 ; 0,3319]) (figure 16C), et la durée de repas tend à être plus importante mais sans significativité (8,669 min [6,121 ; 10,27] vs 6,637 min [4,273 ; 8,123]) par rapport aux souris sauvages (figure 16D).

Alors que l'intervalle entre deux repas semble similaire chez ces deux cohortes tout au long de la journée, un impact du cycle jour/nuit est observé : l'intervalle entre les repas est plus important en phase diurne (souris WT : 145,2 min [111,8 ; 170,7] vs 52,8 min [48,97 ; 63,44] ; souris Thy1-aSYN : 116,3 min [71,5 ; 216,5] vs 45,67 min [34,51 ; 86,26]) (figure 16E).

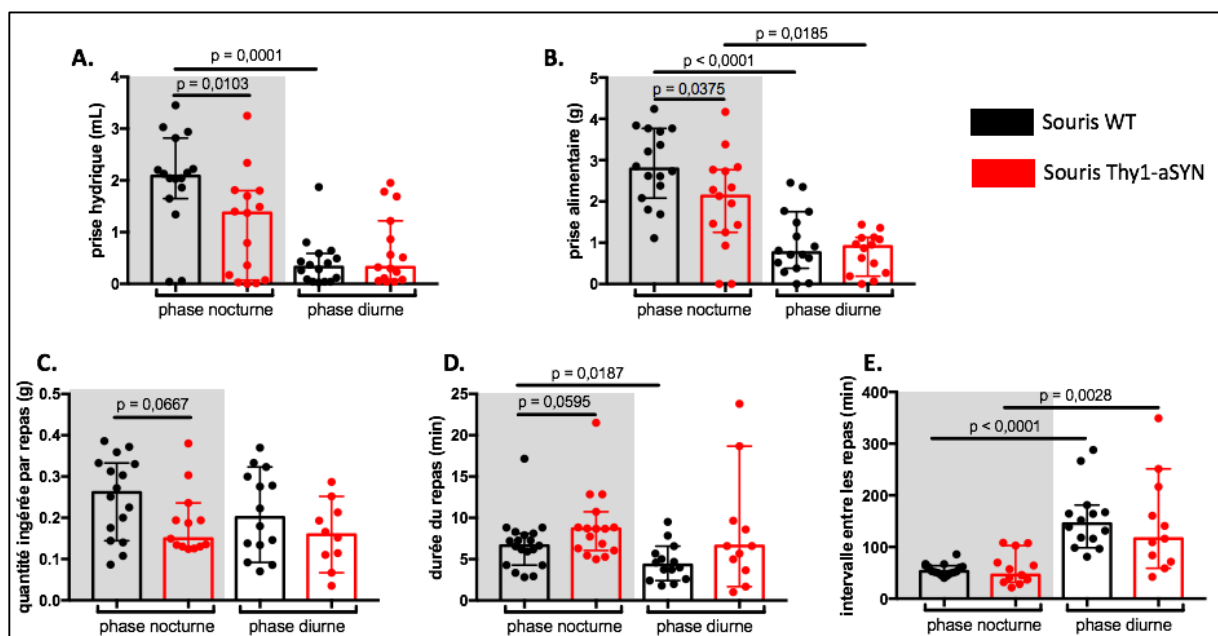


Figure 16 : Analyse de la prise alimentaire des souris âgées de 6 mois. En phase nocturne, les souris transgéniques mangent et boivent moins que les souris sauvages (A, B). La quantité ingérée par repas est moindre pour les souris Thy1-aSYN (C), et la durée du repas a tendance à être plus élevée, sans impacter l'intervalle entre les repas (D, E). Test de Mann-Whitney. N = 16/groupe.

2.3 Activité physique et énergie libérée majorées

L'usage de ces cages métaboliques a permis de mesurer l'activité physique dans l'axe horizontal et vertical et d'étudier la locomotion et le redressement des souris respectivement.

Concernant l'axe vertical, les souris transgéniques ont une activité supérieure aux souris contrôles uniquement en phase diurne (1019 [468 ; 1238] vs 481 [301 ; 879,8]). Et dans l'axe horizontal, les souris transgéniques ont une activité significativement supérieure aux souris contrôles en phase nocturne et diurne (en phase nocturne : 7160 [4169 ; 9461] vs 4450 [3624 ; 5421] et en phase diurne : 2161 [1812 ; 3898] vs 1482 [1161 ; 1769]). Le cycle jour/nuit a également un impact : l'activité est plus importante en phase nocturne pour les 2 cohortes de souris dans l'axe vertical (souris WT : 2834 [1730 ; 3777] vs 481 [301 ; 879,8] et souris Thy1-aSYN : 3338 [2397 ; 6377] vs 1019 [468 ; 1238]) et horizontal (souris Thy1-aSYN : 7160 [4169 ; 9461] vs 2161 [1812 ; 3898] et souris WT : 4450 [3624 ; 5421] vs 1482 [1161 ; 1769]) (figure 17A-B).

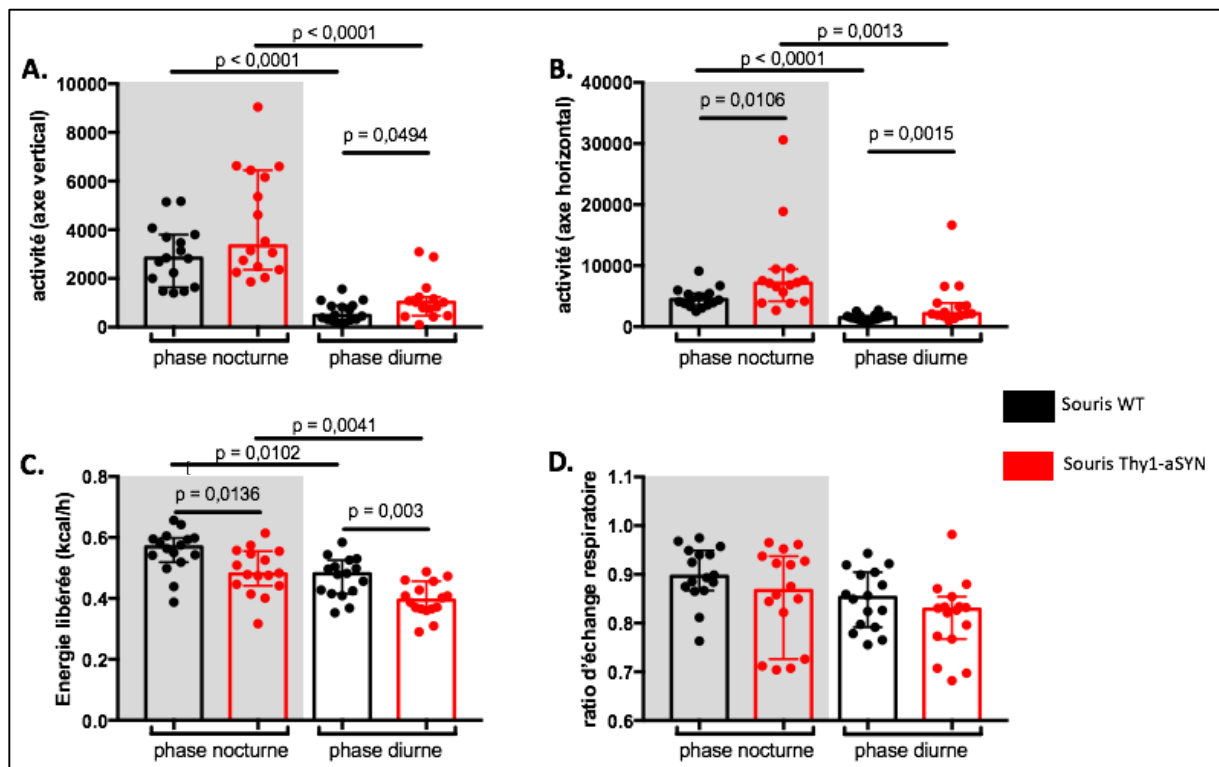


Figure 17 : Activité physique, taux d'énergie libérée et ratio d'échange respiratoire chez les souris Thy1-aSYN et WT âgées de 6 mois. Les souris transgéniques présentent une activité locomotrice et un taux de redressement plus important que les souris sauvages en phase diurne et pour les deux phases respectivement, avec un impact du cycle jour/nuit (A, B). Les souris transgéniques libèrent moins d'énergie que les souris contrôles en phase diurne et nocturne, et cette variation est également dépendante de la phase jour/nuit (C). (D) Aucun effet (génétique et de cycle) n'est cependant observé pour le ratio d'échange respiratoire. Test de Mann-Whitney. N = 16/groupe.

L'énergie libérée par les souris transgéniques est significativement plus faible que les souris contrôles le jour et la nuit (en phase nocturne : 0,4805 kcal/h [0,4431 ; 0,5527] vs 0,5693 kcal/h [0,5248 ; 0,5976] et en phase diurne : 0,3946 kcal/h [0,3657 ; 0,4492] vs 0,4809 [0,4177 ; 0,5204]). Il y a un impact du cycle chez les souris sauvages : la dépense énergétique est plus importante en phase nocturne (souris Thy1-aSYN : 0,4805 kcal/h [0,4431 ; 0,5527] vs 0,3946 kcal/h [0,3657 ; 0,4492] et souris WT : 0,5693 kcal/h [0,5248 ; 0,5976] vs 0,4809 kcal/h [0,4177 ; 0,5204]) (figure 17C).

Enfin, le Ratio d'Echange Respiratoire (RER) est similaire pour les deux cohortes de souris sans effet du cycle jour/nuit (figure 17D).

2.4 Taux de glycémie et de leptinémie plus faibles

Suite aux différences métaboliques observées entre les souris transgéniques et sauvages, la glycémie, l'insulinémie et la leptinémie ont été mesurées chez ces cohortes de souris âgées de 3 et 6 mois.

La glycémie obtenue chez les souris transgéniques n'est significativement pas différente de celle des souris contrôles âgées de 6 mois (170 mg/dL [139,3 ; 179] vs 166 mg/dL [149,8 ; 191]) (figure 18A). En revanche, l'insulinémie et la leptinémie dosées chez les souris transgéniques sont significativement plus faibles que chez les souris sauvages à l'âge de 6 mois (insulinémie : 1,087 µg/L [1,003 ; 2,663] vs 2,764 µg/L [1,566 ; 4,274] et leptinémie : 1025 pg/mL [273,5 ; 2850] vs 6265 pg/mL [3245 ; 9834]) (figure 18B-C).

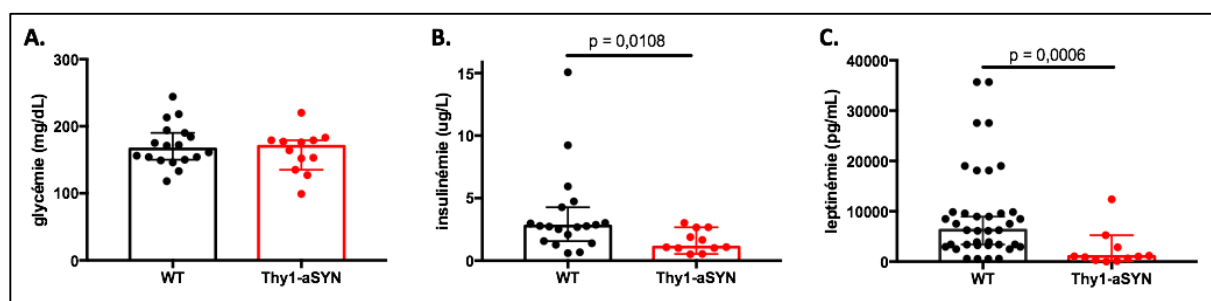


Figure 18 : Dosage plasmatique du glucose, de l'insuline et de la leptine chez les souris âgées de 6 mois. Alors qu'aucune différence significative n'est observée pour la glycémie (A), les souris transgéniques ont une insulinémie et une leptinémie significativement plus faible que les souris sauvages à l'âge de 6 mois (B, C). Test de Mann-Whitney. $n_{WT} = 19$; $n_{Thy1-aSyn} = 11$.

2.5 Surexpression de l' α -synucléine dans l'hypothalamus, associée à une dérégulation de STAT3 et de la voie mTOR

Une étude a été réalisée dans l'hypothalamus des souris âgées de 6 mois, car cette zone est impliquée dans la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique. Les souris transgéniques ont un taux important d' α -synucléine totale (4,387 [2,561 ; 6,685] vs 0,3952 [0,2148 ; 0,7224]), phosphorylée en serine 129 (1,765 [1,109 ; 4,771] vs 0,1465 [0,1187 ; 0,2782]), et agrégée (17,28 [24,22 ; 11,52] vs 0,2311 [0,0636 ; 0,557]), par rapport aux souris contrôles (figure 19).

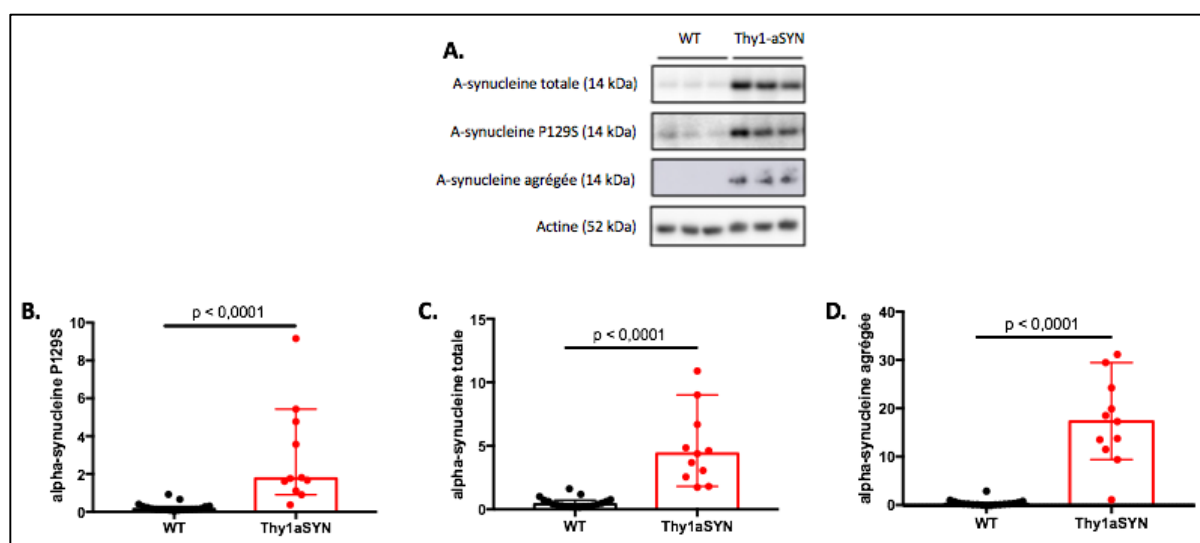


Figure 19 : Analyse protéique des formes totales, phosphorylées et agrégées de l' α -synucléine dans l'hypothalamus des souris Thy1-aSYN et WT âgées de 6 mois. (A) Les résultats obtenus par immunoprinte démontre une expression élevée d' α -synucléine totale (B), phosphorylée en sérine129 (C) et agrégée (par reconnaissance de la structure 5G4 du monomère) (D) dans l'hypothalamus des souris transgéniques. Test de Mann-Whitney. $n_{WT} = 19$; $n_{Thy1-aSyn} = 11$.

Associée à cette surexpression d' α -synucléine, la voie de signalisation mTOR, fortement impliquée dans l'homéostasie énergétique, a été étudiée, ainsi que les voies IRS1 et STAT3 qui sont activées respectivement par l'insuline et la leptine (figure 20A). Alors que la voie IRS-1 ne semble pas varier chez les souris transgéniques (figure 20B), la protéine STAT3 phosphorylée sur le résidu tyrosine 705 est diminuée chez les souris Thy1-aSYN par rapport aux souris contrôles (0,4245 [0,3733 ; 0,5504] vs 0,7266 [0,5345 ; 0,8714]) (figure 20C).

La voie Akt n'est pas significativement différente entre le groupe Thy1-aSYN et WT (figure 20D) ainsi que la voie mTOR, malgré une tendance à l'augmentation de la

forme totale de mTOR chez les souris transgéniques (1,555 [1,221; 2,025] vs 1,049 [0,9472 ; 1,87]) (figure 20E).

Enfin, alors que le taux de raptor (mTORC1) semble similaire entre les deux groupes murins (figure 20F), le taux de rictor (mTORC2) est significativement plus faible chez les souris Thy1-aSYN (0,7321 [0,5365 ; 0,7864] vs 1,309 [1,172 ; 1,39]) (figure 20G).

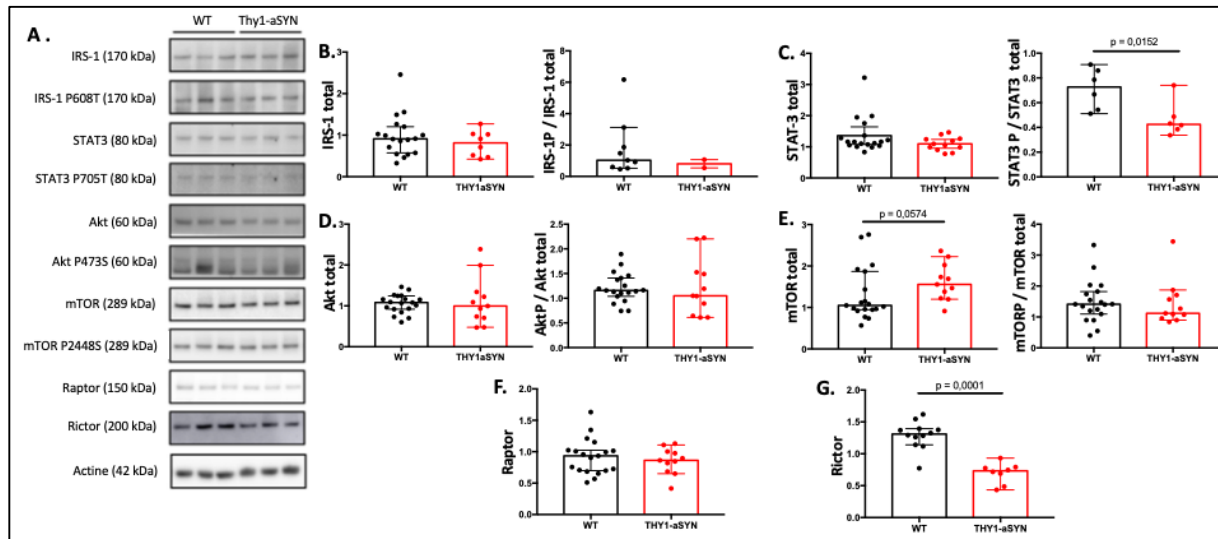


Figure 20 : Analyse par immunoempreinte de l'expression protéique de la voie mTOR dans l'hypothalamus des souris Thy1-aSYN et WT âgées de 6 mois. (A) Résultats obtenus lors de l'analyse protéique. Alors qu'aucune différence n'est observée pour la voie de IRS-1 (B) et akt (D), la proportion STAT3 P/STAT3 total est significativement plus faible chez les souris Thy1-aSYN (C). La voie mTOR est semblable entre les deux groupes mais la forme totale de mTOR a tendance à augmenter chez les souris transgéniques (E). Concernant les protéines mTORC1 et mTORC2, le taux de raptor est significativement plus faible chez les souris transgéniques (F, G). Test de Mann-Whitney. $n_{WT} = 10$; $n_{Thy1-aSyn} = 7$.

3. Etude du système immunitaire du modèle murin Thy1-aSYN

L'utilisation de 9 anticorps nous a permis d'étudier différentes populations du système immunitaire au niveau central et périphérique chez les souris transgéniques âgées de 3, 6 et 12 mois.

Tout d'abord, dans le sang des souris, un impact de l'âge est observé entre les souris âgées de 6 et 12 mois. En effet, on observe à 12 mois, indépendamment du génotype, une diminution des leucocytes (souris WT : 9043 cellules [7002 ; 20236] vs 85349 cellules [76683 ; 100103] et souris Thy1-aSYN : 18782 cellules [11008 ; 22174] vs 87881 cellules [61106 ; 100895]) (figure 21A), des lymphocytes T (souris WT : 7,2% [6,2 ; 11] vs 15,7% [12,15 ; 19,5] et souris Thy1-aSYN : 10,9% [7,1 ; 13,5] vs 15,35% [12,73 ; 19,03]) (figure 21E) et des lymphocytes B (souris WT : 6,4% [2,8 ; 7,4] vs 60,25% [54,83 ; 69,75] et souris Thy1-aSYN : 4% [2,9 ; 9] vs

54,6% [44,73 ; 64,75]) (figure 21D). De plus, les souris transgéniques âgées de 12 mois ont significativement moins de lymphocytes T CD4+ que les souris Thy1-aSYN de 6 mois (Lc T CD4+ : 32,9% [21,5 ; 34,7] vs 50,8% [41,35 ; 54,43]) (figure 21F). A l'inverse, une augmentation des monocytes est significativement observée chez les souris âgées de 12 mois par rapport à celles de 6 mois, quelque soit le génotype (souris WT : 39,2% [30,9 ; 59,5] vs 24,05% [21,88 ; 30,75] et souris Thy1-aSYN : 56,8% [44,4 ; 64,8] vs 30,45% [24,18 ; 38,7]) (figure 21B).

Un effet du génotype est observé uniquement pour les lymphocytes T CD8+ : les souris transgéniques ont significativement moins de Lc T CD8+ que les souris contrôles à 3 mois (21,9% [16,55 ; 26,75] vs 36,4% [31,25 ; 40,3]) et à 6 mois (25,9% [15,15 ; 37,98] vs 36,7% [33,2 ; 39,35]) (figure 21H). Les populations cellulaires NK et T régulatrices présentent des quartiles Q1 Q3 importants et un effet de génotype ou d'âge n'est pas constaté (figure 21C et G).

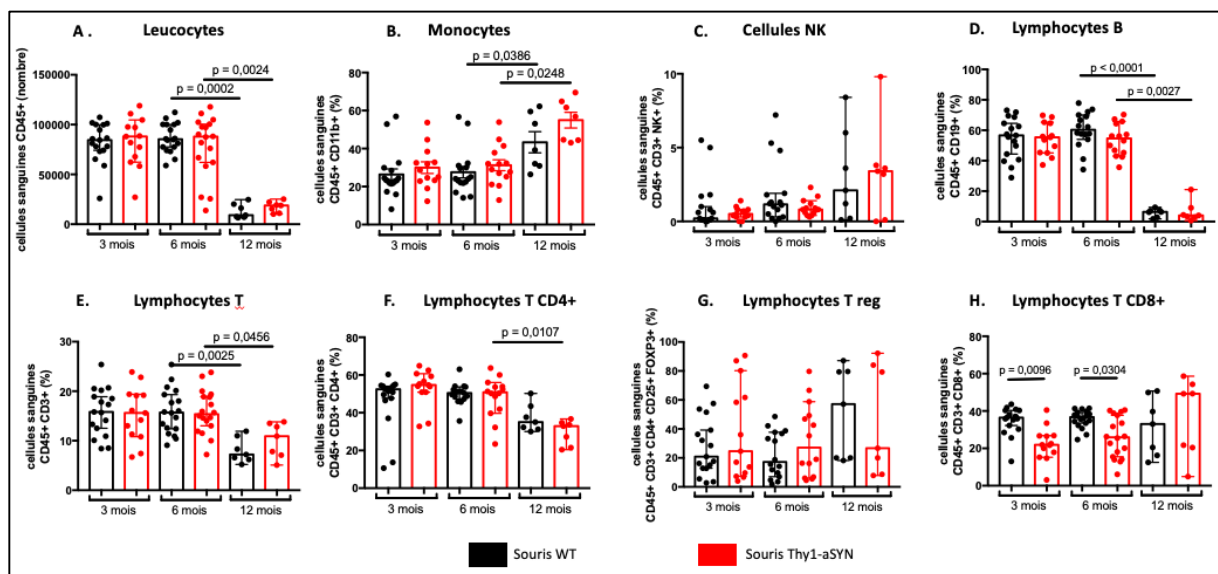


Figure 21 : Représentation des populations du système immunitaire périphérique étudié par cytométrie en flux dans le sang de souris âgées de 3, 6 et 12 mois. Les souris transgéniques et sauvages présentent moins de leucocytes et de lymphocytes T et B à l'âge de 12 mois par rapport à l'âge de 6 mois (A, D, E). Le résultat est similaire uniquement chez les souris transgéniques pour la population lymphocytaire T CD4+ (F). Alors qu'aucune différence significative n'est observée pour les populations lymphocytaires NK (C) et T régulatrices (G), les souris transgéniques âgées de 3 et 6 mois ont significativement moins de lymphocytes T CD8+ que les souris sauvages du même âge (H). Test de Kruskal-Wallis. Effectifs à 3 mois : $n_{WT} = 17$; $n_{Thy1-aSYN} = 13$, à 6 mois : 18/groupe, et à 12 mois : 7/groupe.

Ensuite, l'analyse d'homogénat cérébral a démontré des effets liés à l'âge. Similaire aux résultats dans le sang des souris, sont observées une diminution significative du taux de lymphocytes T CD4+ quelque soit le génotype (souris WT : 3,65% [1,2 ;

8,45] vs 31,25% [14,7 ; 42,95] et souris Thy1-aSYN : 4,2% [1,25 ; 8,45] vs 34,35% [18,13 ; 46,43]) (figure 22F), et également une diminution du taux de lymphocytes T chez les souris transgéniques âgées de 12 mois par rapport à celles âgées de 6 mois (1% [0,5 ; 3,4] vs 4,3% [2,8 ; 10,18]) (figure 22E). De plus, le taux de lymphocytes NK est significativement plus faible chez les souris âgées de 6 mois par rapport à celles âgées de 3 mois, indépendamment du génotype (souris WT : 0,1% [0 ; 0,125] vs 1,15% [0,15 ; 2,75] et souris Thy1-aSYN : 0,1% [0 ; 0,2] vs 0,4% [0,1 ; 0,65]) (figure 22H). Enfin, les taux de macrophages (souris Thy1-aSYN : 3% [0,65 ; 6,55] vs 12,8% [5,675 ; 24,03] et souris WT : 2,8% [1,975 ; 4,25] vs 11,9% [6,7 ; 28,68]) et de microglie (souris Thy1-aSYN : 12,1% [4,75 ; 18,65] vs 75,8% [58,45 ; 79,63] et souris WT : 13,55% [3,825 ; 30,78] vs 75,85% [63,33 ; 88,9]) sont significativement plus faibles chez les souris âgées de 12 mois que de 6 mois, sans effet du génotype (figure 22B et C).

D'autre part, un effet transgène est observé : les souris Thy1-aSYN âgées de 12 mois présentent plus de leucocytes cérébraux qu'à l'âge de 6 mois (29667 cellules [13766 ; 37416] vs 12128 cellules [8804 ; 16749]) (figure 22A).

Aucune différence significative n'est observée pour les lymphocytes B (figure 21D), T régulateurs (figure 21I) et T CD8+ (figure 22G).

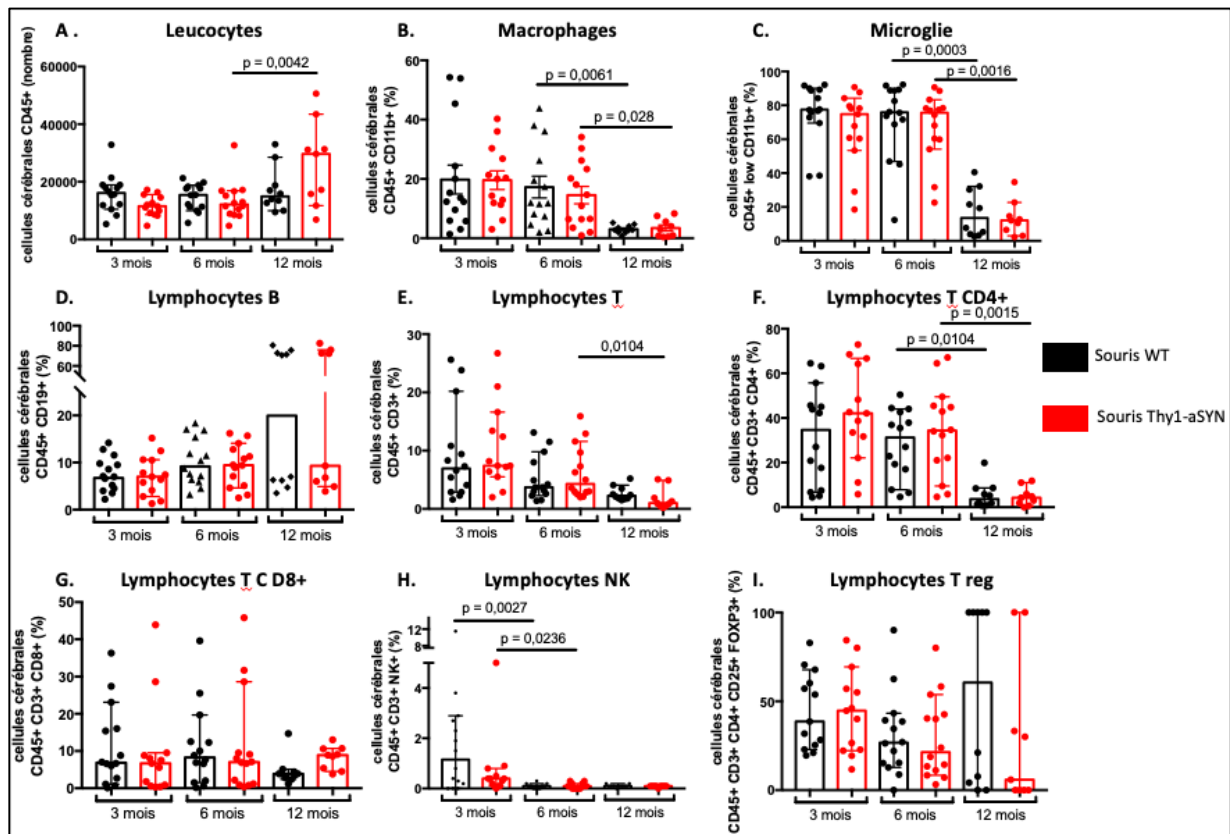


Figure 22 : Représentation des populations du système immunitaire central étudié par cytométrie en flux dans le cerveau de souris âgées de 3, 6 et 12 mois Les souris transgéniques âgées de 12 mois ont un taux de leucocytes supérieur aux souris Thy1-aSYN âgées de 6 mois (A). Les souris transgéniques et sauvages présentent moins de macrophages, de microglie et de lymphocytes T CD4+ à l'âge de 12 mois par rapport à l'âge de 6 mois (B, C, F). Le résultat est similaire uniquement chez les souris transgéniques pour la population lymphocytaire T (E). Alors qu'aucune différence significative n'est observée pour les populations lymphocytaires B (D), T reg (I) et T CD8+ (G), les souris transgéniques et sauvages âgées de 6 mois ont moins de lymphocytes NK cérébraux qu'à l'âge de 3 mois (H). Test de Kruskal-Wallis. Effectifs à 3 mois : $n_{WT} = 14$; $n_{Thy1-aSYN} = 13$, à 6 mois : 14/groupe, et à 12 mois : $n_{WT} = 10$; $n_{Thy1-aSYN} = 9$.

II Modulation pharmacologique de l'activité cérébrale de la glucocérébrosidase

1. Modulation de l'activité de la glucocérébrosidase cérébrale par le traitement par le miglustat et le conduritol- β -époxyde

Tout d'abord, une méthode de dosage du miglustat par CLHP-SM a été mise au point à l'aide du Dr Hélène Carrié et en collaboration avec le PSM-GRITA sur des homogénats cérébraux. La figure 23 démontre bien la présence du miglustat dans le plasma, mais aussi dans un extrait cérébral de souris traitée.

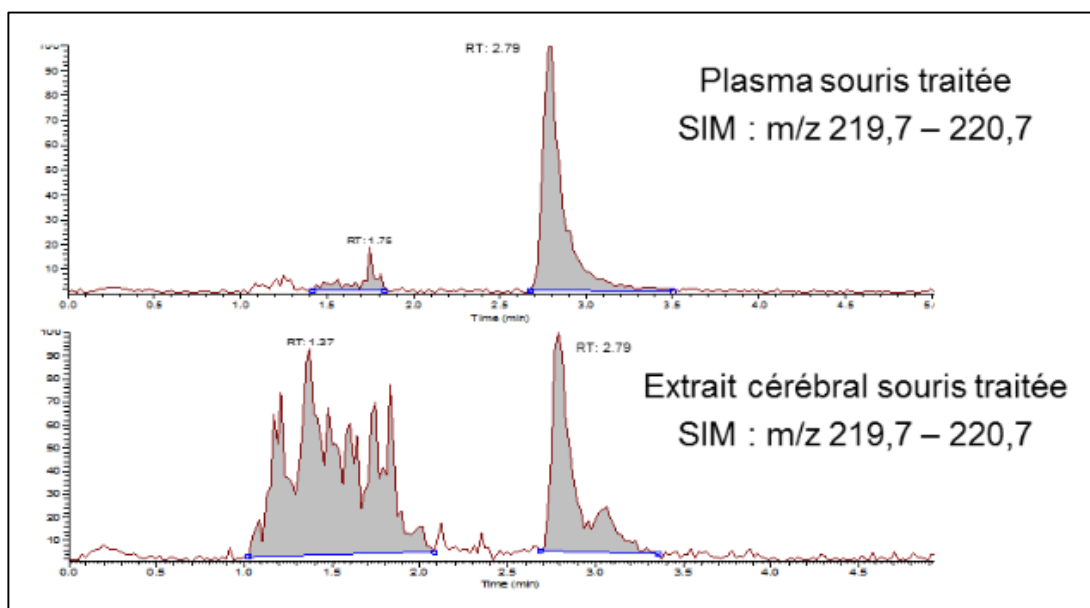


Figure 23 : Données obtenues lors de la quantification du miglustat par CLHP-SM dans le sang et le cerveau de souris traitées. Le miglustat a un temps de rétention de 2,79 minutes.

Ensuite, le dosage de l'activité glucocérébrosidase a été réalisée dans le cerveau des souris traitées par le CBE, le MIG et le PBS. Les souris traitées par CBE ont une activité glucocérébrosidase significativement plus faible que les souris traitées par PBS (souris WT : 46,41% [35,98 ; 66,74] vs 86,47% [66,82 ; 131,7] et souris Thy1-aSYN : 37,16% [21,24 ; 42,06] vs 117,9% [81,87 ; 141,1]). A l'inverse, les souris traitées par MIG présentent une activité glucocérébrosidase significativement plus élevée que leurs contrôles (souris WT : 151,5 % [120,3 ; 214,7] vs 86,47% [66,82 ; 131,7] et souris Thy1-aSYN : 171,4% [131,1 ; 242,3] vs 117,9% [81,87 ; 141,1]). Notons qu'aucun effet transgène n'est observé chez les souris traitées par PBS (figure 24A). De plus, l'expression protéique est similaire entre les différents groupes de souris (figure 24B).

Des glycosphingolipides ont été quantifiés par spectrométrie de masse dans le cortex sensorimoteur des souris (figure 24C). Les taux de GalCer sont significativement plus faibles chez les souris traitées par CBE ou MIG par rapport aux souris traitées par PBS, quelque soit le génotype. Et à l'inverse, les taux de GlcCer sont significativement plus élevés chez les souris traitées par MIG ou CBE par rapport aux contrôles.

Concernant l'évolution des gangliosides, les souris sauvages traitées par MIG ont tendance à avoir moins de GM1 que leur contrôle, et les souris sauvages traitées par CBE moins de GD1a (figure 24D).

Enfin, un effet transgène est observé : les souris Thy1-aSYN traitées par du PBS ont significativement plus de céramides que les souris sauvages traitées par PBS (figure 24C).

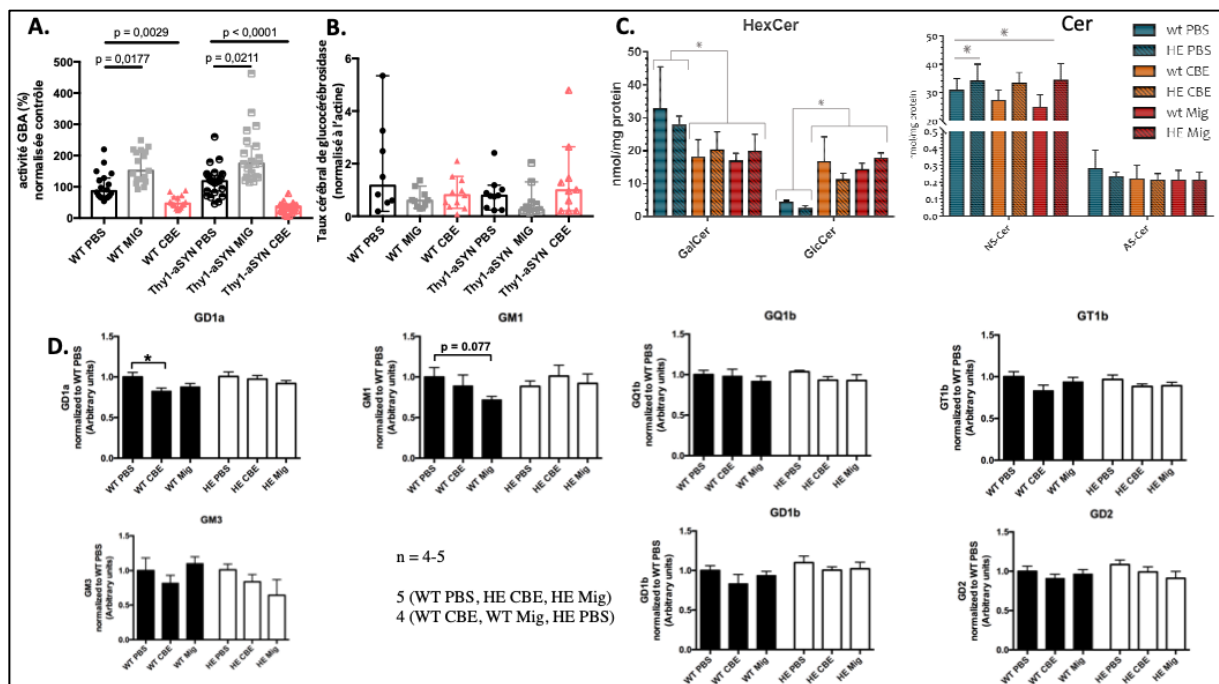


Figure 24 : Evolution de l'activité de la glucocérebrosidase, de ses substrats et produits cérébraux suite à la modulation pharmacologique de la glucocérebrosidase. L'activité cérébrale de la glucocérebrosidase est diminuée chez les souris traitées par CBE et augmentée chez les souris traitées par MIG (A), sans variation de l'expression protéique (B). Les GalCer sont diminués et les GlcCer augmentés chez les souris traitées par MIG ou CBE par rapport à celles traitées par PBS (C). De plus, le traitement par CBE diminue le taux de GD1a chez les souris sauvages, et le traitement par MIG diminue le taux de GM1 chez ces mêmes souris (D). Un effet transgène est observé : les souris Thy1-aSYN présentent plus de céramides que les souris sauvages (C). Test de Kruskal-Wallis. N = 5/groupe.

2. Impact de cette modulation sur les troubles non moteurs des souris Thy1-aSYN

Différents critères ont été évalués, tels que l'évolution du poids et la motricité fine. Tout d'abord, après les 14 jours de traitement, les souris traitées par le CBE ont un poids significativement plus faible que les souris traitées par PBS, quelque soit le génotype (souris WT : -2,093 g [- 4,549 ; -0,358] vs 0,2303 g [-1,796; 1,81] et souris Thy1-aSYN : -4,439 g [- 9,822 ; - 0,4216] vs -1,014 g [- 3,331; 0,3681]). Cependant la variation du poids avant et après le traitement est similaire pour les souris Thy1-aSYN et contrôles traitées par le miglustat et le PBS (figure 25A).

Tout d'abord, le test de challenge de la poutre montre uniquement un effet transgène : les souris Thy1-aSYN prennent plus de temps à traverser la poutre

(9,162 s [7,723 ; 11,67] vs 5,855 s [4,628 ; 7,2]), font plus de pas lors d'une traversée (17,4 [15,95 ; 18,5] vs 15,9 [15,6 ; 17,35]), et font plus d'erreurs par pas (1,002 [0,7822 ; 1,298] vs 0,4242 [0,3658 ; 0,6496]) (figure 25C).

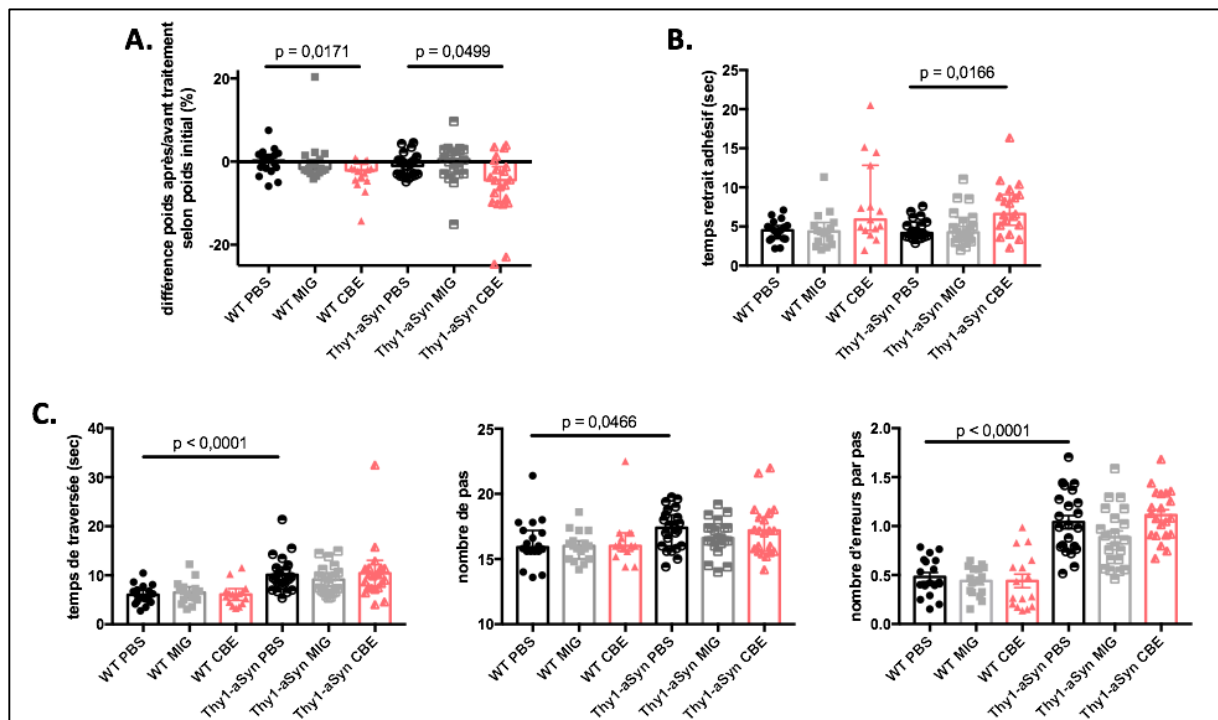


Figure 25 : Evolution du poids corporel et des troubles de motricité fine chez les souris Thy1-aSYN et WT traitées par PBS, MIG et CBE. Une différence d'évolution de poids entre le début et la fin du traitement est observé uniquement les souris traitées par CBE : les souris prennent moins de poids, quelque soit leur génotype (A). Alors que seul un effet transgène est observé dans le test de challenge de la poutre (C), le traitement par CBE entraîne un temps de retrait de l'adhésif significativement plus important chez les souris transgéniques (B). Test de Kruskal-Wallis et Mann-Whitney. Effectifs à 3 mois : $n_{WT\ PBS} = 19$; $n_{Thy1-aSyn\ PBS} = 22$, à 6 mois : $n_{WT\ CBE} = 17$; $n_{Thy1-aSyn\ CBE} = 20$, et à 12 mois : $n_{WT\ MIG} = 17$; $n_{Thy1-aSyn\ MIG} = 20$.

Néanmoins, un effet du traitement par CBE est observé uniquement chez les souris transgéniques lors du test du retrait de l'adhésif : les souris transgéniques traitées par le CBE prennent plus de temps à retirer l'adhésif que les souris Thy1-aSYN traitées par le PBS (6,6 s [5,16 ; 9,07] vs 4,15 s [3,66 ; 5,57]) (figure 25B).

3. Impact de cette modulation sur les taux plasmatiques et cérébraux d' α -synucléine

La forme totale d' α -synucléine a été quantifiée dans le cerveau de souris par méthode ELISA et immunoempreinte (figure 26A). Alors qu'un effet traitement n'a été observé par les deux méthodes, les souris transgéniques présentent plus d' α -synucléine que les souris contrôles (1,615 [1,435 ; 2,11] vs 0,2061 [0,1499 ; 0,2618])

(figure 26B). Les résultats sont similaires pour la forme P129S dans le cerveau, où seul un effet transgène est observé : la forme phosphorylée est surexprimée chez les souris transgéniques (2,514 [1,748 ; 4,075] vs 0,07688 [0,03687 ; 0,8375]) (figure 26B). Par contre, la forme agrégée humaine d'α-synucléine, quantifiée par FRET, ne montre pas d'effet transgène et d'effet traitement (figure 26D).

Dans le sang, la forme totale a été quantifiée chez les souris transgéniques par une technique ELISA reconnaissant la forme humaine de l'α-synucléine. Les souris Thy1-aSYN traitées par miglustat ont un taux significativement plus faible d'α-synucléine dans le sang que celles traitées par le PBS (2106 µg/mL [1648 ; 2531] vs 3161 µg/mL [2078 ; 4448]) (figure 26E), sans variation significative du taux d'hémoglobine dans ces échantillons plasmatiques (figure 26F).

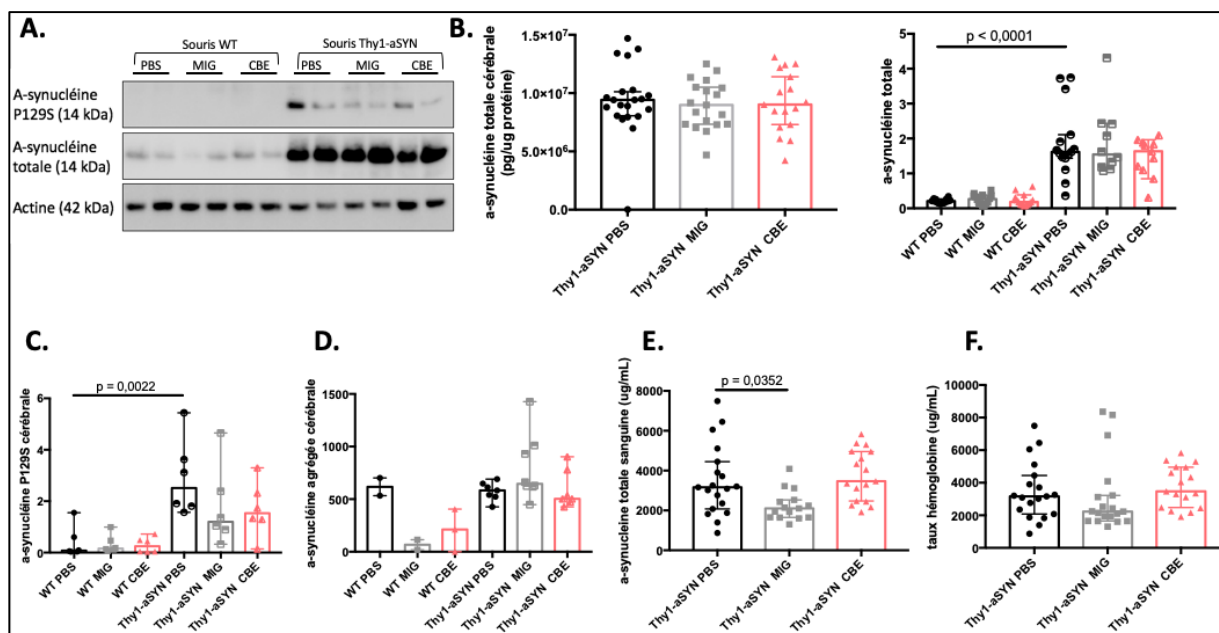


Figure 26 : Quantification protéique de l'α-synucléine cérébrale et sanguine. (A) Représentation des formes d'α-synucléine obtenues par immuno-empreinte. Les souris transgéniques surexpriment la forme totale (B) et phosphorylée P129S (C) dans le cerveau en regard des souris contrôles, sans effet traitement. Concernant la forme agrégée, aucun effet traitement ou transgène n'a été significativement observé (D). Par contre, dans le sang, le traitement par le miglustat diminue le taux sanguin d'α-synucléine par rapport aux souris traitées par le PBS (E) sans variation du taux d'hémoglobine (F). Test de Kruskal-Wallis. Effectifs aSYN total : 19/groupe en ELISA et 6/groupe en WB ; aSYN P129S : 13/groupe, aSYN agrégée : 2/groupe WT, 8/groupe

4. Impact de cette modulation sur la voie de signalisation mTOR et l'autophagie

Les protéines raptor et rictor, associées aux unités mTORC1 et mTORC2 respectivement, ont été quantifiées par immunoempreinte (figure 27A). Un effet

transgène est significativement observé : les souris transgéniques surexpriment la protéine raptor par rapport aux souris contrôles (0,9068 [0,5991 ; 1,548] vs 0,562 [0,4439 ; 0,9796]) (figure 27C). Un effet traitement par miglustat est observé pour ces sous-unités associées à mTOR. En effet, les souris transgéniques traitées par le MIG expriment moins de protéine rictor que les souris transgéniques traitées par le PBS (0,2251 [0,1926 ; 0,3981] vs 0,7813 [0,3023 ; 1,06]) (figure 27B). Et les souris sauvages traitées par le MIG expriment davantage la protéine raptor que les souris traitées par PBS (1,122 [0,8352 ; 1,835] vs 0,562 [0,4439 ; 0,9796]) (figure 27C). La protéine LC3B permettant d'étudier l'activité autophagique a été également analysée, mais aucune variation entre les différents groupes n'a été décelé (figure 27D).

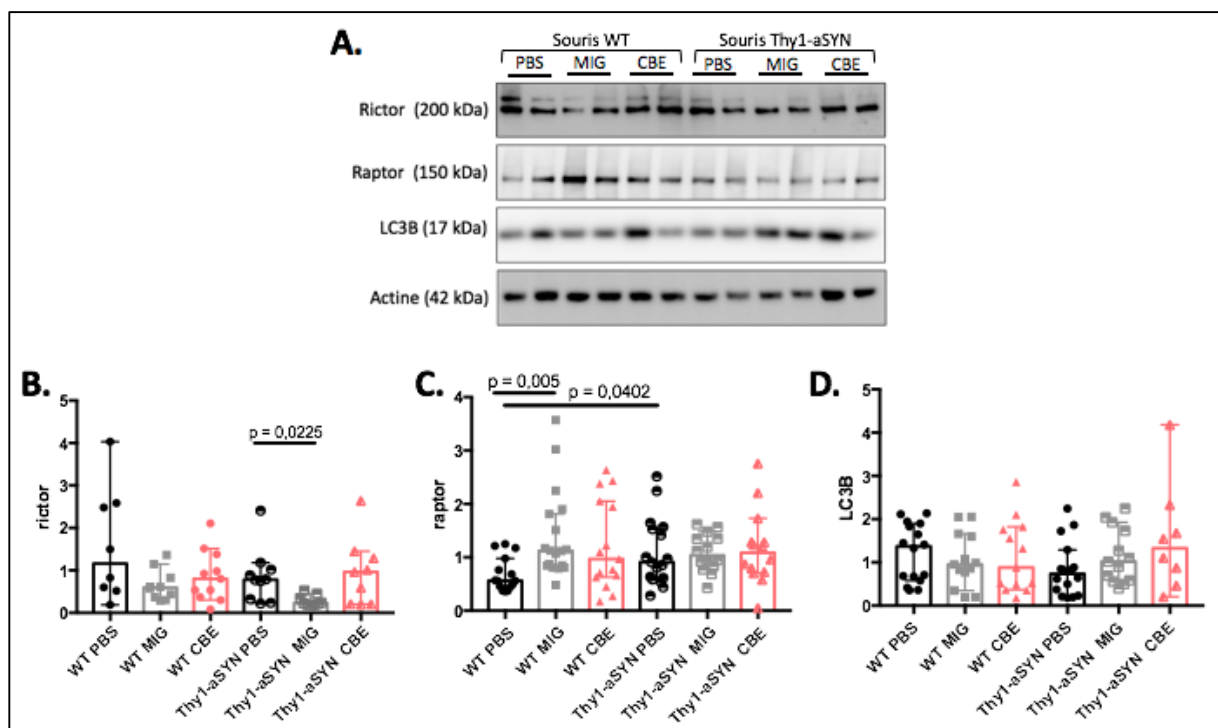


Figure 27 : Etude de la voie de signalisation mTOR et de l'activité autophagique par immuno-empreinte. (A) Représentation des résultats obtenus par immuno-empreinte. (B) L'effet traitement du miglustat est associé à une diminution du taux rictor chez les souris transgéniques, et une augmentation du taux de raptor chez les souris sauvages. (C) De plus, les souris transgéniques ont un taux augmenté de raptor. (D) L'activité autophagique ne semble pas varier selon le traitement ou le génotype des souris. Test de Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney. N = 10/groupe

5. Impact de la modulation sur l'inflammation

L'impact du traitement a été étudié sur la réponse immunitaire par cytométrie en flux.

Dans le sang, les lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont les seules populations cellulaires étudiées associées à un effet traitement. Le taux de lymphocytes T CD4+ est significativement plus important chez les souris sauvages traitées par CBE que chez les souris traitées par PBS (56,8% [52,4 ; 60 ,25] vs 52,4% [47,1 ; 54,2]) (figure 28F).

De plus d'un effet transgène est observé sur les populations T CD8+, avec une diminution de ce taux chez les souris Thy1-aSYN (21,9% [16,55 ; 26 75] vs 36,4% [31,25 ; 40,3]). L'effet du traitement CBE est différent selon le transgène de la sousti : sous CBE, les souris WT ont moins de lymphocytes T CD8+ (30,9% [25,93 ; 34,9] vs 36,4% [31,25 ; 40,3]) alors que les souris Thy1-aSYN en présentent davantage par rapport à leurs contrôles respectifs (30,25% [25,08 ; 32,15] vs 21,9% [16,55 ; 26,75]) (figure 28H). Aucun effet n'est observé dans le sang pour les populations monocytaires et lymphocytaires NK, B, et T régulatrices (figure 28A à E, et G).

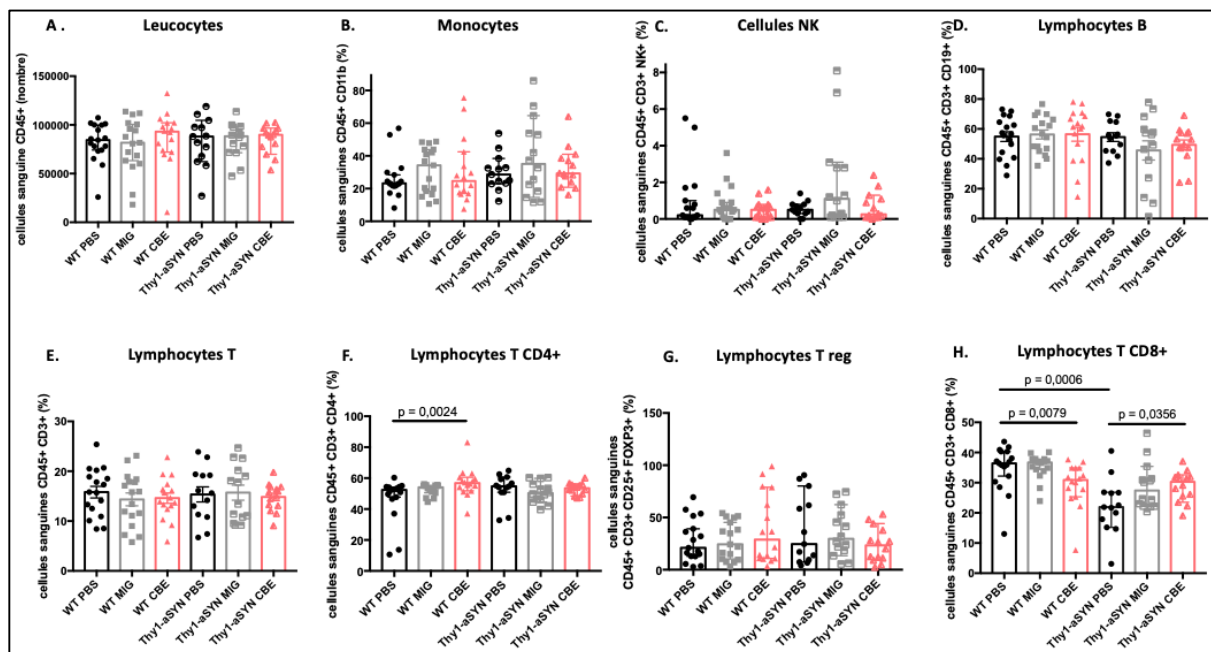


Figure 28 : Représentation des populations du système immunitaire périphérique étudié par cytométrie en flux dans le sang de souris traitées par PBS, MIG et CBE. La majorité des populations cellulaires étudiées ne varie pas en fonction du traitement et du génotype (A à E, G). Néanmoins, les souris transgéniques présentent moins de lymphocytes T CD8+ que les souris sauvages (H). Un impact du traitement est décelé pour les populations lymphocytaires T CD4+ et T CD8+ : les souris sauvages traitées par CBE présentent plus de lymphocytes T CD4+ (F) et moins de T CD8+ (H), alors que les souris transgéniques présentent davantage de lymphocytes T CD8+. Test de Kruskal-Wallis. Effectifs à 3 mois : $n_{WT\ PBS} = 17$; $n_{Thy1-aSyn\ PBS} = 13$, à 6 mois : $n_{WT\ CBE} = 17$; $n_{Thy1-aSyn\ CBE} = 14$, et à 12 mois : $n_{WT\ MIG} = 16$; $n_{Thy1-aSyn\ MIG} = 14$.

Puis, au niveau cérébral, le traitement par CBE augmente significativement le taux de leucocytes cérébraux chez les souris transgéniques (19312 cellules [15848 ;

28395] vs 11517 [8901 ; 15090] (figure 29A). Ce résultat est associé à une augmentation des différentes populations leucocytaires cérébrales sans modification de la proportion des différentes sous-populations monocytaires et lymphocytaires (figure 29B à I).

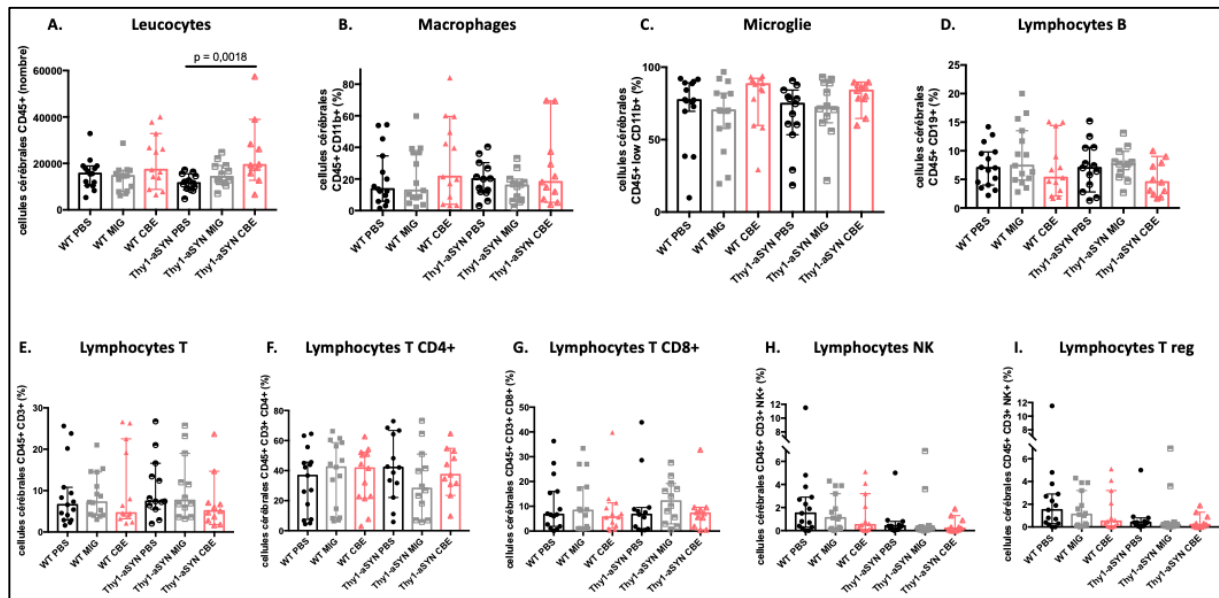


Figure 29 : Représentation des populations du système immunitaire central étudié par cytométrie en flux dans le cerveau des souris traitées par PBS, MIG et CBE. Le traitement par CBE entraîne une augmentation des populations leucocytaires dans le cerveau des souris transgéniques (A), sans modification de proportion des différentes sous-populations leucocytaires étudiées (B-I). Test de Kruskal-Wallis et de Mann et Whitney. Effectifs à 3 mois : $n_{WT\ PBS} = 15$; $n_{Thy1-aSyn\ PBS} = 13$, à 6 mois : $n_{WT\ CBE} = 15$; $n_{Thy1-aSyn\ CBE} = 12$, et à 12 mois : $n_{WT\ MIG} = 13$; $n_{Thy1-aSyn\ MIG} = 11$.

Enfin, les astrocytes jouant un rôle important dans la neuroinflammation, le GFAP a été quantifié par immuno-empreinte (figure 30A). En effet, l'augmentation d'expression protéique de GFAP est associée à une activation astrocytaire. Nos données ne montrent pas de variation du taux protéique de GFAP dans nos différents échantillons cérébraux (figure 30B).

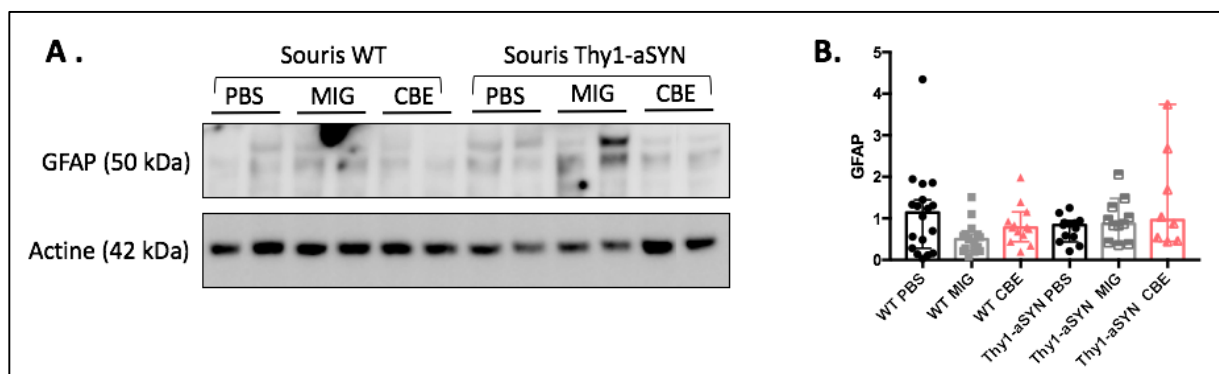


Figure 30 : Etude de l'expression protéique cérébrale de GFAP. L'expression protéique de GFAP a été quantifiée par immuno-empreinte (A). Aucun effet traitement et transgène n'a été observé (B). Test de Kruskal-Wallis et Mann et Whitney. N = 12/groupe.

DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'évaluer la modulation de l'activité glucocérébrosidase sur l'accumulation de l' α -synucléine, la neuroinflammation et le phénotype d'un modèle murin évoquant des stades précoces de la maladie de Parkinson.

Le travail a été réalisé sur le modèle murin Thy1-aSYN qui accumule l' α -synucléine humaine non mutée sous le promoteur Thy1, permettant son expression pan-neuronale [Rockenstein et coll., 2002]. En effet, une étude démontre que l' α -synucléine est augmentée d'un facteur 2 à 3 dans toutes les zones cérébrales dès 10 jours de vie, sauf dans le thalamus et le cervelet où cette surexpression atteint un facteur 5 à 6 [Chesselet et coll., 2012]. De plus, cette accumulation d' α -synucléine a également été rapportée dans les neurones mésentériques à l'âge de 8 mois [Wang et coll., 2012]. D'autre part, l'agrégation de l' α -synucléine cérébrale évolue avec l'âge de la souris : le nombre et la taille de ces agrégats protéinase K résistants sont plus importants chez les souris plus âgées. Ces agrégats ont été observés dès l'âge de 1 mois dans les bulbes olfactifs, le noyau dorsal du nerf vague, le thalamus, le cervelet et le *locus coeruleus*, puis à l'âge de 5 mois dans la substance noire [Chesselet et coll., 2012]. Cette progression spatiale et temporelle de l'agrégation protéique dans des tissus cérébraux spécifiques sous-entend une similitude à la progression de l'accumulation de l' α -synucléine selon l'hypothèse de Braak dans la maladie de Parkinson. En effet cette hypothèse suggère que la pathologie des corps de Lewy (corps cellulaire contenant de l' α -synucléine agrégée) apparaîtrait tout d'abord dans les bulbes olfactifs et le noyau dorsal du nerf vague, puis dans le *locus coeruleus*, et puis dans le mésencéphale dont la substance noire. Cependant, la transmission ne reproduit que partiellement le phénomène *prion-like* retrouvé chez certains patients parkinsoniens bénéficiant d'une greffe neuronale [Li et coll., 2008 ; Kordower et coll., 2008]. En effet l'équipe de Rockenstein a greffé des cellules souches neuronales de souris dans l'hippocampe de ce modèle en 2002. Des corps d'inclusions enrichis en α -synucléine ont été observées dans ces cellules 1 à 4 semaines après la greffe, sans présence de forme fibrillaire [Desplats et coll., 2009]. Enfin, chez les souris Thy1-aSYN, la forme aSYN P129S (forme de l' α -synucléine prépondérante dans les corps de Lewy) est retrouvée à un taux plus élevé dans la substance noire, le striatum, le cortex, l'hippocampe, sans variation significative dans le thalamus, le cervelet et les bulbes olfactifs.

Associée à cette accumulation d' α -synucléine, ces souris développent rapidement une neuroinflammation, définie par une activation microgliale, dans le striatum à l'âge de 1 mois puis dans la substance noire à l'âge de 5 mois. Une activation du système immunitaire adaptatif au niveau périphérique est ensuite détectée à un âge plus avancé de la souris (14 mois), où les taux de lymphocytes T CD4+ et CD8+ sanguins sont plus importants [Watson et coll., 2012]. Il est intéressant de noter qu'une neuroinflammation précoce est également observée chez les patients parkinsoniens [Ouchi et coll., 2009], ainsi qu'une augmentation des taux sanguins de lymphocytes T CD8+ [Baba et coll., 2005].

Enfin, la perte de dopamine dans le striatum des souris est rapidement progressive. En effet, ce modèle murin ne présente pas de variation de la quantité de dopamine jusqu'à l'âge de 12 mois, puis perd 40% du taux de dopamine au niveau striatal à l'âge de 14 mois [Lam et coll., 2011]. A 22 mois, le nombre de neurones dopaminergiques dans la partie compacte de la substance noire est stable, mais une perte en dopamine et une diminution du diamètre des neurones TH+ restants ont été détectés. Avant la perte cérébrale en dopamine, ces souris présentent un taux de dopamine striatal extracellulaire plus important, un dérèglement de l'efflux dopaminergique, et un dérèglement de la modulation des récepteurs dopaminergiques à l'âge de 6 mois [Lam et coll., 2011]. Or, dans la maladie de Parkinson, il est supposé qu'une neurodégénérescence dopaminergique progressive est associée à une perte du taux de dopamine [Fearnley et Lees, 1991]. L'excès de dopamine décrit dans ce modèle pourrait être à l'origine d'une neurodégénérescence, notamment en induisant la production de 6-OHDA neurotoxique [Blum et coll., 2001].

Comme décrit dans la littérature, ce modèle murin présente à un jeune âge (3 mois) des altérations qui peuvent être observés en phase précoce de la maladie de Parkinson, tels qu'une constipation, une perte de poids, une altération de la fonction olfactive et de la motricité fine. Néanmoins, ce modèle développe, avant la perte de dopamine au niveau striatal, des troubles comportementaux qui ne sont pas décrits dans les stades précoces de la maladie de Parkinson, tels qu'une hyperactivité motrice associée à un dérèglement de l'efflux dopaminergique, et des troubles cognitifs. La présence à l'âge de 5 mois de troubles cognitifs et d'une accumulation neuronale d' α -synucléine peut suggérer que la souris Thy1-aSYN soit un modèle de syndrome parkinsonien présentant des altérations cognitives précoces, qui font penser à d'autres synucléinopathies comme la démence à corps de Lewy et la

paralyse supranucléaire progressive. Cependant, les souris Thy1-aSYN ne présentent pas les signes caractéristiques de ces pathologies. En effet, l'absence d' α -synucléine agrégée dans le cortex de ces souris ne sous-entend pas un modèle de démence à corps de Lewy, et l'apparition tardive de troubles moteurs majeurs améliorés par les traitements dopaminergiques n'évoque pas un modèle de paralyse supranucléaire progressive.

Puis, les souris Thy1-aSYN âgées de 14 mois présentent une perte de dopamine dans le striatum associée à des altérations motrices majeures qui régressent par traitement à la L- DOPA [Fleming et coll., 2006]. Cette altération motrice majeure répondant au traitement dopaminergique, et associée à une perte de dopamine suggère une similarité à la phase motrice de la maladie de Parkinson.

Ce modèle présente donc certaines altérations observées dans la maladie de Parkinson au niveau histopathologique (une agrégation progressive d' α -synucléine dans les neurones, une neuroinflammation puis une activation du système immunitaire adaptatif, une perte de dopamine au niveau striatal) et phénotypique (apparition de troubles non moteurs précoces, puis de troubles moteurs majeurs répondant à la L-DOPA). De plus, la perte tardive du taux de dopamine au niveau striatal suggère que les souris Thy1-aSYN jeunes miment un stade précoce de la maladie de Parkinson. Ce modèle peut être ainsi utilisé pour mieux comprendre l'impact d'une accumulation d' α -synucléine agrégée sur l'activation du système inflammatoire et la survenue de troubles phénotypiques (tels qu'une variation du poids corporel, un trouble de la motricité fine et de l'olfaction), avant la perte massive du taux de dopamine au niveau striatal [Chesselet et coll., 2012].

Pour répondre aux objectifs, l'étude du modèle murin Thy1-aSYN semble pertinente. En effet, parmi les modèles murins mimant certains aspects du syndrome parkinsonien, dont une accumulation de l' α -synucléine, on note les modèles génétiques surexprimant une forme d' α -synucléine mutée ou native, deux modèles environnementaux (les modèles paraquat/maneb et roténone) et d'autres modèles impliquant une altération physiopathologique potentiellement impliquée dans la neurodégénérescence dopaminergique (les modèles C-Rel-NFKB, MitoPark, Atg7 et VMAT2) [Blesa et Przedborski, 2014]. Tout d'abord, les modèles murins par ingestion de paraquat/maneb et de roténone développent également des signes non moteurs à un jeune âge et une perte en dopamine, mais des difficultés de reproductibilité du modèle et la toxicité liée à l'ingestion de ces composés peuvent limiter leur usage [Tinakoua et coll., 2015 ; Betarbet et coll., 2000 ; Friedman et coll.,

2012]. D'autre part, les modèles MitoPark et Atg7 développent une inflammation et des troubles moteurs tardifs associés à une perte de dopamine, mais sans détection d' α -synucléine agrégée [Good et coll., 2011 ; Ekstrand et coll., 2007 ; Ahmed et coll., 2012]. Puis le modèle C-Rel-NFKB présente tardivement de l' α -synucléine agrégée dans le mésencéphale, mais elle n'est pas détectée dans le striatum [Baiguera et coll., 2012 ; Good et coll., 2011]. Le modèle VMAT2, quant à lui, présente des troubles non moteurs précoces mais l' α -synucléine s'accumule tardivement, environ 14 mois après l'apparition de ces signes non moteurs [Taylor et coll., 2011]. L'utilisation d'un modèle génétique surexprimant l' α -synucléine non mutée va permettre d'étudier spécifiquement l'impact de cette accumulation sur le développement d'autres altérations observables dans les syndromes parkinsoniens. L'injection de l' α -synucléine par méthode virale va permettre une expression spécifique de la protéine dans la zone cérébrale injectée. Cependant l'utilisation de promoteurs permet une meilleure reproductibilité chez la souris. Parmi les promoteurs utilisés, les modèles PrP-aSYN et TH-aSYN ne présentent pas de neurodégénérescence dopaminergique, alors que le modèle Thy1-aSYN permet d'observer une perte modérée des neurones dopaminergiques [Blesa et Przedborski, 2014].

I Evolution des populations du système immunitaire

L'inflammation semble être un facteur pathogénique majeur de la progression de la maladie de Parkinson. En effet, les signes moteurs et non moteurs pourraient être associés à une expansion de l'inflammation [Kannarkat et coll., 2013]. Dans notre étude, les populations du système immunitaire ont été évaluées dans le sang et le cerveau du modèle murin Thy1-aSYN à l'âge de 3, 6 et 12 mois. L'analyse à ces 3 âges permet d'étudier l'impact de la progression temporelle et spatiale des agrégats d' α -synucléine sur l'inflammation, avant la perte de dopamine au niveau striatal. Plusieurs paramètres ont été pris en compte lors de l'étude afin d'éviter une activation inflammatoire aspécifique. Tout d'abord, l'utilisation du promoteur Thy1-aSYN permet de surexprimer l' α -synucléine dans le thymus, ce qui permet une tolérance du système immunitaire à l' α -synucléine humaine non mutée. De plus, l'hébergement dans une animalerie EOPS limite l'activation du système immunitaire.

Et enfin, la manipulation des souris par la même personne pendant l'étude limite le stress pouvant être responsable d'une inflammation [Deak et coll., 2015].

La combinaison de neuf anticorps a permis d'analyser 7 populations cellulaires du système immunitaire. Cependant, l'interprétation des cellules présentes physiologiquement en faible proportion est complexe, car, afin d'observer un effet inter-individuel, les échantillons n'ont pas été regroupés. Ainsi, pour pouvoir étudier davantage l'évolution de ces populations cellulaires minoritaires, il faudrait regrouper différents échantillons d'un même groupe, voire augmenter le nombre d'animaux par groupe afin de diminuer la variance obtenue.

1. Evolution en fonction de l'âge des populations du système immunitaire au niveau périphérique

Dans le sang de ces souris, la majorité des populations du système immunitaire évolue dans le même sens chez les souris transgéniques ainsi que les contrôles du même âge. L'absence de variation entre les souris jeunes (âgées de 3 et 6 mois) et l'évolution des proportions chez les souris plus âgées (âgée de 12 mois) tend à supposer que les variations du système immunitaire observées en périphérie seraient liées au vieillissement de la souris, indépendamment de l'agrégation de l' α -synucléine. Les souris âgées de 12 mois présentent une augmentation de la proportion des monocytes, et une diminution de la proportion des leucocytes (dont les lymphocytes B et T), et dont la diminution des lymphocytes T CD4+ est significative uniquement chez les souris Thy1-aSYN. Par ailleurs, une évolution des populations du système immunitaire dépendante de l'âge est observée chez l'Homme dans la littérature. En effet, les taux de leucocytes et de lymphocytes T CD4+ sanguins sont plus faibles chez les personnes âgées [Moro-Garcia et coll., 2013 ; Nikolich-Zugich, 2008 ; Linton et Dorshkind, 2004], ce qui augmenterait la susceptibilité des personnes âgées à développer une neurodégénérescence [Fulop et coll., 2010]. De plus, le nombre de monocytes sanguins ne semble pas varier avec l'âge chez l'Homme, mais les monocytes âgés activés ont une réponse moins efficace [Metcalf et coll., 2017].

Associés à ces résultats liés au vieillissement du modèle, notre étude révèle que l'accumulation de l' α -synucléine affecte la proportion de lymphocytes T CD8+ sanguins. En effet, les souris Thy1-aSYN ont moins de lymphocytes T CD8+ sanguins à l'âge de 3 et 6 mois par rapport aux souris contrôles du même âge, puis à

l'âge de 12 mois, ce taux a tendance à augmenter et le ratio CD4+/CD8+ tend à diminuer. Dans la littérature, Watson et collaborateurs ont constaté que les lymphocytes T CD4+ et CD8+ ont tendance à être en plus grande proportion chez les souris transgéniques, avec une augmentation significative de ces lymphocytes à l'âge de 22 mois. La différence de résultats entre cette étude et la nôtre pourrait être liée à la méthode de cytométrie en flux utilisée. En effet, l'étude de Watson a différencié ces sous-populations en utilisant uniquement les marqueurs CD4+ et CD8+, alors que nous avons isolé ces sous-populations grâce à 3 anticorps différents (marqueurs CD45+, CD3+, CD4+ ou CD8+). Ainsi quantifier ces lymphocytes des souris Thy1-aSYN à l'âge de 12, 18 et 24 mois avec notre méthode pourrait permettre de conclure sur nos résultats préliminaires. Les lymphocytes T sanguins ont également été étudiés dans le modèle murin MPTP, qui présente, à l'âge de 2 mois, une diminution du taux de lymphocytes T CD4+ et une augmentation du taux lymphocytes T CD8+, associées à une diminution du ratio CD4+/CD8+ [Zhou et coll., 2018]. D'autre part, les études réalisées à partir de sang de sujets parkinsoniens montrent une diminution du ratio CD4+/CD8+ et des résultats variables concernant le taux de leucocytes sanguins : les lymphocytes T CD4+ seraient inchangés ou diminués et les lymphocytes T CD8+ inchangés ou augmentés [Chiba et coll., 1995 ; Bas et coll., 2001 ; Hisanaga et coll., 2001 ; Baba et coll., 2005 ; Niwa et coll., 2012]. Les lymphocytes T de ces malades présentent des dommages nucléaires qui peuvent résulter d'un stress oxydant [Migliore et coll., 2002 ; Bas et coll., 2001 ; Stevens et coll., 2012] provoqué par la rupture de vésicules contenant des oligomères d' α -synucléine lors de l'endocytose [Freeman et coll., 2013]. Ainsi il serait intéressant d'étudier les fonctions lymphocytaires dans le modèle Thy1-aSYN, et l'impact des oligomères d' α -synucléine sur la survenue de dommages nucléaires potentiels dans ces lymphocytes sanguins. Nous pourrions étudier cela spécifiquement dans les aires cérébrales où une agrégation d' α -synucléine a été détectée, c'est à dire dans les bulbes olfactifs, le thalamus et le cervelet des souris Thy1-aSYN à l'âge de 1 mois, et la substance noire à l'âge de 5 mois. D'une part, doser des marqueurs d'oxydation nous permettrait d'évaluer le stress oxydant dans ces zones cérébrales. Et d'autre part, une étude d'immunohistochimie cérébrale utilisant des anticorps ciblant l' α -synucléine agrégée et les lymphocytes T CD8+ pourrait détecter une co-localisation potentielle. L'immunophénotypage de ces lymphocytes pourrait être réalisé selon la méthode de Thiel : après avoir isolé ces lymphocytes T, un activateur de prolifération

lymphocytaire pourrait être ajouté (tel qu'un anticorps anti-CD3), puis un test de prolifération par incorporation de BrdU permettrait d'analyser l'activation lymphocytaire des souris Thy1-aSYN par cytométrie en flux [Thiel et coll., 2004].

2. Evolution des populations du système immunitaire au niveau central

Au niveau cérébral, la proportion des cellules du système immunitaire est similaire entre les souris transgéniques et les souris contrôles à l'âge de 3 et 6 mois. Puis les taux cérébraux de microglies et de lymphocytes T CD4+ chez les souris âgées de 12 mois sont plus faibles que chez les souris âgées de 6 mois. De plus, l'augmentation du taux de leucocytes cérébraux chez les souris Thy1-aSYN âgées de 12 mois suggère que l'accumulation d' α -synucléine aurait pour conséquence une augmentation tardive du taux de leucocytes cérébraux. Ces résultats sont novateurs car seule l'activation microgliale avait été étudiée dans le cerveau de ce modèle murin. Il est connu dans la littérature que le nombre de microglies activées est plus important dans le striatum des souris Thy1-aSYN à l'âge de 1 mois, et dans la substance noire à l'âge de 6 mois [Watson et coll., 2012]. Ainsi il serait intéressant dans le futur que nous prenions en compte le taux de microglie et leur état d'activation. En effet, différentes études ont montré que l'activation microgliale, mais également des lymphocytes T, avaient un rôle majeur dans le développement des syndromes parkinsoniens *in vivo* [Roy et coll., 2008 ; Ghosh et coll., 2007]. L'activation chronique des lymphocytes T périphériques pourrait activer la microglie [Dasgupta et coll., 2003 et 2005 ; Kurkowska-Jastrzebska et coll., 1999]. De plus, l'activation des lymphocytes T CD4+ et l'infiltration de monocytes périphériques *in vivo* pourraient être engendrées par l'accumulation d' α -synucléine, qui à son tour pourrait être responsable d'une neurodégénérescence [Harms et coll., 2018 ; Brochard et coll., 2009]. Néanmoins, l'hypothèse d'une infiltration de monocytes périphériques *in vivo* n'est pas démontrée. D'autres modèles de syndromes parkinsoniens surexprimant l' α -synucléine présentent des variations des taux cérébraux de microglies et de lymphocytes. Parmi les modèles générés par ingestion de toxiques, les souris traitées par le MPTP, par l'association paraquat/maneb et par la roténone développent une activation microgliale [Sherer et coll., 2003 ; Cicchetti et coll., 2005 ; Saint-Pierre et coll., 2006], et les souris traitées par la 6-OH-DOPA développent une activation microgliale et une infiltration de lymphocytes T CD8+ dans le striatum [Kaur et Prakash, 2017 ; McGeer et McGerr, 1998 ; Ip et coll., 2015 ;

Theodore et Maragos, 2015]. Les modèles génétiques C-Rel-NFKB (impliqué dans le complexe NFKB) et α -synucléine A53T présentent une activation microgliale [Baiguera et coll., 2012 ; Henrich et coll., 2018 ; Hoenen et coll., 2016]. De plus, une activation microgliale et une infiltration des lymphocytes T sont observées dans un modèle murin surexprimant par méthode virale l' α -synucléine humaine native dans la substance noire [Harms et coll., 2013 ; Theodore et coll., 2008]. Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ isolés de patients parkinsoniens présentent une hypersensibilité à l' α -synucléine, ce qui suggèrent le rôle de la microglie, mais également du système immunitaire adaptatif, dans la neurodégénérescence [Sulzer et coll., 2017]. Ainsi nous pourrions analyser les lymphocytes T CD8+ et la microglie qui semblent dérégulés dans ce modèle murin surexprimant l' α -synucléine. D'une part, une quantification par cytométrie en flux des populations lymphocytaires et de la microglie dans différentes zones cérébrales spécifiques, telles que la substance noire et le striatum, serait utile pour suggérer une infiltration lymphocytaire et monocyttaire. La mise au point réalisée dans le cadre de cette thèse pourrait être réutilisée, en analysant le striatum et la substance noire, car notre analyse s'est portée sur un hémisphère cérébral. D'autre part, nous pourrions dans ces zones cérébrales réaliser de l'immunohistochimie pour repérer un potentiel co-marquage de l' α -synucléine avec les lymphocytes T CD8+ et les microglies. Afin de quantifier la microglie activée, suite à l'immunomarquage par l'anticorps anti-IBA1, une analyse de la taille de ces cellules permettrait de quantifier leur activité, notamment par une taille plus importante liée à leur ramification [Batchelor et coll., 1999].

II Le phénotype des souris Thy1-aSYN dès 3 mois

Trois tests ont été utilisés afin de caractériser la coordination et la motricité fine de ces souris : le test du pole, le test du retrait de l'adhésif et le test de challenge de la poutre. L'utilisation de plusieurs tests comportementaux standardisés permet d'évaluer plus spécifiquement la coordination et la motricité fine des souris (car un test comportemental sollicite souvent plusieurs fonctions différentes) et de limiter les biais de reproductibilité (en utilisant des tests validés pour ce modèle dans la littérature) [Sukoff Rizzo et Silverman, 2018].

Nous avons observé une limite dans l'utilisation du test du pole lors de notre étude. La variabilité inter-individuelle du temps de descente du pole chez les souris Thy1-

aSYN est importante car de nombreuses souris glissaient du pole malgré sa texture rainurée. Ainsi nos résultats ne sont pas similaires à ceux de la littérature pour ce modèle, à savoir un temps de descente majoré à l'âge de 3 mois [Fleming et coll., 2004]. Néanmoins, le temps de retournement plus important des souris Thy1-aSYN âgées de 12 mois suggèrent un trouble de coordination et de l'équilibre chez ce modèle. Ensuite, bien que les souris Thy1-aSYN prennent significativement plus de temps pour retirer leur adhésif à l'âge de 3 et 12 mois, le résultat obtenu chez les souris âgées de 6 mois semble similaire entre les souris transgéniques et contrôles. Cependant l'étude de Fleming a démontré cette altération chez les souris Thy1-aSYN âgées de 6 mois [Fleming et coll., 2004]. Dans notre étude, la variabilité inter-individuelle plus importante chez les souris Thy1-aSYN âgées de 6 mois pourrait expliquer ce résultat non significatif. Néanmoins l'altération observée dès l'âge de 3 mois suppose que le modèle présente une altération précoce de la dextérité et des fonctions sensorimotrices. Enfin, le test du challenge de la poutre a été utilisé afin d'évaluer la coordination, l'équilibre, mais également la motricité fine par ajout d'une grille le jour du test. Les souris transgéniques font plus d'erreurs par pas lors du passage de la poutre dès l'âge de 3 mois. Ces résultats sont semblables à ceux décrits par Fleming et collaborateurs, où ce même phénotype est observé dès l'âge de 2 mois. Ainsi, l'analyse de ces trois tests comportementaux démontre que ces souris transgéniques développent un trouble de motricité fine dès l'âge de 3 mois.

D'autre part, le test habituation/déshabituaiton évaluant la fonction olfactive a été mis au point chez des souris âgées de 3 et 12 mois. Les souris transgéniques âgées de 3 et 12 mois reniflent moins les caissettes que les souris contrôles lors du premier, du deuxième et du dernier essai. De plus, seules les souris contrôles reniflent significativement plus les caissettes contenant les nouvelles odeurs. Dans la littérature, les souris Thy1-aSYN réalisant ce test olfactif sont capables de détecter une nouvelle odeur à l'âge de 3 mois, puis elles ont plus de difficultés à différencier les odeurs par rapport aux souris contrôles à l'âge de 9 mois. Nos données obtenues, semblables à ceux de la littérature, permet donc de suggérer que ce modèle Thy1-aSYN sont atteints de troubles olfactifs dès l'âge de 3 mois. L'utilisation de plusieurs tests olfactifs permettrait de confirmer ce phénotype précoce. En effet, un seul test a été développé car l'hébergement EOPS limite la réalisation de différents tests olfactifs pour des raisons hygiéniques. Il était impossible notamment de réaliser le test du bloc (où un bloc souillé d'urine de souris est échangé entre les

cages) ou le test du pellet (où la stérilisation de la nourriture utilisée pourrait dénaturer l'odeur).

Enfin, la pesée à différents âges a permis de mettre en évidence une perte de poids des souris Thy1-aSYN dès l'âge de 3 mois, qui perdure jusqu'à l'âge de 12 mois. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature, où une perte de poids est démontrée dans ce modèle murin dès l'âge de 2 mois [Fleming et coll., 2004].

Tous les tests comportementaux réalisés dans notre étude présentent des résultats semblables à ceux de la littérature et mettent en exergue la robustesse du modèle Thy1-aSYN.

Ces troubles sont également observés dans d'autres modèles de la maladie de Parkinson. Parmi les modèles toxiques, les modèles créés par administration de la 6-OH-DOPA, de la roténone, du paraquat, et de l'association paraquat/maneb développent un trouble de la coordination et de la motricité fine [Glajch et coll., 2012 ; Pan-Montojo et coll., 2010 ; Thiruchelvam et coll., 2003]. De plus, les souris MPTP présentent un trouble de la coordination et de la motricité fine [Tillerson et coll., 2002] ainsi qu'un trouble olfactif [Vezoli et coll., 2011]. Parmi les autres modèles, un trouble olfactif est détecté chez les souris déficientes en VMAT2 [Taylor et coll., 2009]. Enfin, parmi les modèles génétiques, les souris α -SYN A53T présentent une perte de poids, des troubles sensorimoteurs [Paumier et coll., 2013] et un trouble olfactif [Zhang et coll., 2015]. Le modèle TgD9 développe un trouble de la coordination motrice [Amschl et coll., 2013], et le modèle ATP13A2 des troubles sensorimoteurs tardifs [Schultheis coll., 2013]. Ces divers troubles sont observés dans d'autres modèles où l' α -synucléine n'est pas surexprimée, suggérant l'implication de différents facteurs dans l'apparition de ce phénotype.

D'autre part chez l'Homme, en amont des signes moteurs caractéristiques de la maladie, les sujets parkinsoniens peuvent être atteints d'une hyposmie [Postuma et coll., 2012] et d'une micrographie qui serait associée à un trouble de la coordination motrice et de la dextérité [Dounskaia et coll., 2009]. De plus, la majorité des patients parkinsoniens présentent une perte de poids, qui peut apparaître précocément dans la maladie [Cheshire et Wszolek, 2005 ; Chen et coll., 2003]. Cette perte de poids peut entraîner l'apparition de troubles cognitifs, dépressifs, et des troubles moteurs, suggérant un lien entre cette perte de poids et le processus neurodégénératif [Wills et coll., 2016 ; Cumming et coll., 2017 ; Van der Marck et coll., 2012 ; Pilhatsch et coll., 2013]. En effet, une corrélation a été observée chez ces patients entre l'indice de masse corporelle et la perte de dopamine nigro-striatale

[Lee et coll., 2016 ; Pak et coll., 2018]. Les mécanismes impliquant cette perte de poids sont peu connus à ce jour, mais différentes études supposent un déséquilibre entre la prise énergétique et l'énergie libérée [Uc et coll., 2006 ; Kistner et coll., 2014 ; De Pablo-Fernandez et coll., 2017 ; Aiello et coll., 2015 ; Capecchi et coll., 2013]. En effet cette perte de poids pourrait être liée à une diminution de la prise alimentaire, une augmentation de la dépense énergétique, ou à un dérèglement d'hormones impliquées dans l'homéostasie énergétique telles que la leptine, l'insuline, et la ghréline.

III Les souris transgéniques présentent des troubles métaboliques

Afin de mieux comprendre cette perte de poids précoce, une caractérisation métabolique a été réalisée chez ce modèle murin Thy1-aSYN, qui n'a pas été à ce jour étudiée dans la littérature.

1. Composition corporelle

Tout d'abord, le CT-Scan a permis de déceler une diminution de la masse grasse viscérale et sous-cutanée chez les souris transgéniques âgées de 6 mois, sans modification de la masse maigre. Ces résultats suggèrent que la perte de poids observée chez les souris Thy1-aSYN pourrait être liée à une perte de masse grasse. Cette perte de poids associée à une diminution de la masse grasse est observée chez des rats traités par la 6-OH-DOPA, et des souris aSYN A53T [Wang et coll., 2017 ; Meng et coll., 2015 ; Paumier et coll., 2013]. De plus, plusieurs études menées chez des sujets parkinsoniens suggèrent que la perte de poids précéderait de plusieurs années l'apparition des troubles moteurs [Sharma et Lewis, 2017], et serait liée à une perte de masse grasse [Lorefalt et coll., 2004 ; Markus et coll., 1993].

Le CT-Scan a également été utilisé pour analyser la densité moyenne osseuse, car la maladie de Parkinson et la perte de poids sont des facteurs de risque d'ostéoporose et de fractures [Dobson et coll., 2012 ; Torsney et coll., 2014]. A l'âge de 6 mois, les souris transgéniques et sauvages ne montrent pas de différence significative de densité de masse osseuse (données non présentées). Il serait intéressant d'analyser cette densité osseuse plus tardivement dans notre modèle.

2. Caractérisation du phénotype métabolique

L'utilisation de cages métaboliques a permis d'étudier le phénotype de ces souris âgées de 6 mois, où une perte de poids et de masse grasse a été reportée. Les souris Thy1-aSYN présentent une prise alimentaire et hydrique diminuée. Ce dérèglement pourrait être lié à d'autres altérations décrites dans la littérature, tels que des troubles de détection et de discrimination olfactive [Fleming et coll., 2008], une constipation et/ou un stress lié à leur phénotype [Wang et coll., 2008]. De plus, l'hyperactivité de ce modèle transgénique, décrite dans la littérature au même âge, pourrait être expliquée par une concentration striatale importante en dopamine [Lam et coll., 2011 ; Zhuang et coll., 2011]. Cette augmentation du taux de dopamine est observée également dans d'autres modèles parkinsoniens tels que le modèle murin surexprimant l' α -synucléine sous le promoteur tyrosine hydroxylase [Thiruchelvam et coll., 2004], les souris déficitaires du gène *Parkin* [Itier et coll., 2003], ou du gène *DJ-1* [Kim et coll., 2005], le modèle murin présentant la mutation G2019S du gène *LRRK2* [Longo et coll., 2014], et le modèle de rat surexprimant l' α -synucléine par méthode virale [Chung et coll., 2009]. Ces données suggèrent que la surexpression de l' α -synucléine, aussi bien que d'autres mutations entraînant la maladie de Parkinson, induisent des perturbations importantes du système dopaminergique nigrostrié. Cette libération de dopamine pourrait être un facteur d'une neurodégénérescence dopaminergique, car il est responsable d'un stress oxydant relatif à la toxicité de la dopamine en excès [Sulzer, 2007 ; Mosharov et coll., 2009 ; Michel et Hefti, 1990 ; Filloux et Townsend, 1993 ; Hastings et coll., 1996]. De plus, le système dopaminergique nigro-strié étant impliqué dans la prise alimentaire, un excès de dopamine pourrait diminuer la prise alimentaire chez les souris Thy1-aSYN [Ungerstedt et coll., 1971 ; Szczyepka et coll., 2001]. En effet, bien que la relation entre la dopamine et le comportement alimentaire soit complexe, une voie dopaminergique surexprimée ou sous-exprimée peut motiver ou inhiber la prise alimentaire au niveau de l'hypothalamus [Berridge et coll., 2010 ; Palmiter, 2007 ; Salamone et Correa, 2013]. Enfin, la diminution de l'énergie libérée suppose que la perte de masse des souris transgéniques n'est pas liée à une augmentation de la dépense énergétique. Le RER, qui est un indicateur du rapport de l'oxydation des acides gras/oxydation des glucides, a tendance à être réduit chez les souris Thy1-aSYN par rapport aux souris sauvages, suggérant qu'elles utilisent davantage leurs graisses comme source d'énergie et réduisent ainsi leur stockage. Ce trouble

énergétique peut être expliqué par une altération de la thermogénèse adaptative, associée à une variation de la proportion du tissu adipeux et du taux de leptine, et à une activation de la réponse inflammatoire [Pandit et coll., 2017 ; Villarroya et coll., 2018].

Suite à la découverte de ces troubles métaboliques, l'insuline et la leptine ont été dosées dans le sang car elles ont un rôle majeur dans la prise alimentaire [Palmiter, 2007] et la dépense énergétique *via* leurs récepteurs situés dans l'hypothalamus [Shioda et coll., 1998]. Les souris Thy1-aSYN présentent un taux plasmatique de leptine et d'insuline significativement plus faible que les souris contrôles à l'âge de 6 mois, sans variation de la glycémie et sans insulino-résistance (résultats non présentés). De plus, la diminution plasmatique de la leptine, qui régule les réserves de graisse dans l'organisme, pourrait être à l'origine de cette perte de masse corporelle [Lorefalt et coll. 2004 ; Fiszler et coll., 2010]. Enfin, cette hormone est connue dans la littérature pour intervenir dans la plasticité synaptique, la modulation des récepteurs glutamatergiques, et sa diminution de concentration pourrait être responsable de troubles cognitifs [Harvey, 2013]. Ainsi cette hypoleptinémie précoce peut également jouer un rôle sur les troubles cognitifs observés à un âge jeune dans ce modèle murin.

Des modèles *in vivo* de syndrome parkinsonien présentent également des troubles métaboliques. Le modèle murin surexprimant aSYN A53T mange plus et présente une diminution de la leptinémie et une majoration de la prise alimentaire. Sous un régime hypercalorique, ces souris présentent une obésité, une résistance à l'insuline et une augmentation de l'énergie libérée [Guerreiro et coll., 2016 ; Rothman et coll., 2014]. Des rats traités par la 6-OH-DOPA présentent une diminution de la masse grasse sans perte de poids [Kuranuki et coll., 2011]. Et l'administration cérébrale chronique de roténone chez des rats surexprimant l' α -synucléine va induire une diminution du poids corporel [Mulcahy et coll., 2013].

Certaines études rapportent que les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent une diminution de la masse corporelle et d'adiposité quelques années avant l'apparition des troubles moteurs caractéristiques [Cheshire et Wszolek, 2005 ; Chen et coll., 2003 ; Durrieu et coll., 1992 ; Barone et coll., 2009]. Cette perte de poids peut être expliquée par une augmentation de l'apport énergétique corporel [Chen et coll., 2003], mais également par une diminution de la prise alimentaire liée à une perte d'appétit, des troubles de l'humeur, une hyposmie ou une constipation [Sheard et coll., 2011 ; Abbott et coll., 1992]. De plus, la

diminution cérébrale du taux d'insuline et de ces récepteurs [Takahashi et coll., 1996] pourrait contribuer à la neurodégénérescence par différents mécanismes. En effet cette baisse d'insuline cérébrale pourrait entraîner un stress oxydant, une diminution de la synthèse dopaminergique, une neuroinflammation par augmentation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et potentiellement un dépôt cérébral d' α -synucléine [Gao et coll., 2008 ; Spielman et coll., 2014 ; Frank-Cannon et coll., 2009]. Enfin, la diminution plasmatique de la leptine observée chez ces patients parkinsoniens peut être liée à une baisse secondaire à la perte de poids [Lorefalt et coll., 2009]. L'évolution de l'énergie libérée chez les sujets parkinsoniens est complexe. Les troubles moteurs de la maladie, notamment la rigidité musculaire, augmenteraient l'énergie libérée au repos [Markus et coll., 1992]. Cependant, malgré l'augmentation de cette énergie libérée au repos, l'énergie libérée journalière semble plus faible car elle est fortement diminuée lors d'un exercice physique [Toth et Poehlman, 2000]. Donc la perte de poids ne serait pas liée à une libération d'énergie plus importante. L'énergie libérée est régulée par l'activité physique, le taux métabolique basal et la thermogénèse adaptative, qui peuvent être contrôlés au niveau central par l'hypothalamus. L'hypothalamus et le tronc cérébral contrôlent la thermogénèse du tissu brun [Rui, 2013], et les hormones de satiété (insuline et leptine) qui vont augmenter l'énergie libérée [Rezai-Zadeh et Munzberg, 2013]. Une étude de thermogénèse pourrait être réalisée afin de constater un potentiel dérèglement associé à cette baisse d'énergie libérée. En effet, les résultats issus du modèle de rat 6-OH-DOPA suggère que le tissu adipeux brun soit impliqué dans la lipolyse et la perte de masse grasse, et potentiellement dans les troubles métaboliques de la maladie de Parkinson [Wang et coll., 2017 ; Meng et coll., 2015].

3. Etude de l'accumulation de l' α -synucléine et de la voie de signalisation mTOR dans l'hypothalamus

L'hypothalamus participe à la régulation du poids corporel, au métabolisme énergétique et intervient dans la régulation de l'appétit, notamment par l'implication de la dopamine [Palmiter, 2007]. Ainsi cette zone cérébrale a été analysée pendant ce projet.

D'une part, la présence chez les souris Thy1-aSYN d'une surexpression de l' α -synucléine totale, agrégée et phosphorylée P129S suggère que cette accumulation protéique pourrait être responsable du phénotype métabolique. Dans la maladie de

Parkinson, l' α -synucléine est également accumulée dans l'hypothalamus [Lykkebo et Jensen, 2002], ce qui suppose son implication dans les signes cliniques métaboliques de la maladie [De Pablo-Fernandez et coll., 2017 ; Politis et coll., 2008].

D'autre part, devant l'accumulation d' α -synucléine dans l'hypothalamus et la diminution de l'insuline et la leptine plasmatique dans le modèle Thy1-aSYN, un dérèglement de la voie mTOR a été recherché dans cette zone cérébrale. En effet, la voie mTOR est une voie de signalisation impliquée dans la régulation énergétique, qui est modulable par la leptine et l'insuline, [Laplante et Sabatini, 2009 ; Takei et Nawa, 2014 ; Martinez de Morentin et coll., 2014]. Plus précisément, la leptine est impliquée dans la régulation de la prise alimentaire et de l'énergie libérée par l'intermédiaire de récepteurs exprimés dans l'hypothalamus [Tartaglia et coll., 1995].

La voie d'activation de STAT3, dépendante de la leptine, est diminuée chez les souris transgéniques âgées de 6 mois. Ceci, associée à une diminution de la leptine plasmatique, suggère un dérèglement central de cette voie, qui peut impacter le phénotype métabolique [Morris et Rui et coll., 2009]. De plus, ces souris présentent une diminution des niveaux protéiques de la sous-unité rictor appartenant au complexe mTORC2. Sachant que la voie STAT3 active mTOR, la diminution de son activation peut être responsable de la diminution du taux protéique de la sous-unité rictor [Roa et Tena-Sempere et coll., 2014]. Contrairement à mTORC1, la fonction de mTORC2 est moins connue dans la régulation énergétique. Tout d'abord, mTORC2 régule l'activité synaptique et la morphologie neuronale [Haissaguerre et Cota, 2015]. De plus, elle peut faciliter à son tour l'activation de mTORC1 [Oh et Jacinto, 2011]. Enfin, la voie de signalisation de mTORC2 joue un rôle majeur dans la régulation énergétique et de l'homéostasie du glucose [Kocalis et coll., 2014]. En effet, la délétion de cette protéine dans tous les neurones peut provoquer une augmentation de la masse grasse et de l'adiposité, une intolérance et une résistance à la leptine. Enfin des cellules *in vitro* ont démontré le rôle de mTORC2 dans la maturation des lymphocytes T CD8+ mémoires et dans le métabolisme de glycolyse [Pollizzi et coll., 2015]. Parmi les mécanismes de régulation du comportement alimentaire au niveau de l'hypothalamus, certains neurones ayant pour cible principale l'insuline et la leptine libèrent des hormones anorexigènes et orexigènes qui peuvent être activées par le stress oxydant [Rui, 2013 ; Cheung et coll., 1997 ; Cowley et coll., 2001 ; Lin et coll., 2010]. Des études *post-mortem* de sujets parkinsoniens montrent une diminution du taux d'orexine dans l'hypothalamus, et les

taux neuronaux d'orexines et de mélanines semblent corrélés à la sévérité de la maladie [Drouot et coll., 2003 ; Thannickal et coll., 2007 ; De Pablo-Fernandez et coll., 2017 ; Kistner et coll., 2014]. Une étude a démontré la présence de corps de Lewy dans ces zones cérébrales à une phase précoce de la maladie, où l'accumulation évolue avec la progression de la maladie [De Pablo-Fernandez et coll., 2016]. De plus, la ghréline est un peptide orexigène, diminué chez les sujets parkinsoniens, qui a démontré un potentiel effet neuroprotecteur sur les neurones dopaminergiques nigro-striés de souris MPTP, suggérant un fort impact des troubles métaboliques sur la neurodégénérescence [Stievenard et coll., 2017]. Réaliser une analyse d'immunohistochimie dans le noyau arqué afin d'analyser une corrélation entre la localisation de l' α -synucléine et la localisation de ces neurones pourrait permettre de comprendre davantage ce trouble métabolique.

IV Impact de la modulation pharmacologique de l'activité glucocérébrosidase dans le modèle murin Thy1-aSYN

La deuxième partie du travail a consisté à moduler l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase lysosomale dans le cerveau des souris Thy1-aSYN. En effet, la perte d'activité est fréquemment présente chez les sujets parkinsoniens, même en l'absence de mutation du gène *GBA*. Ainsi, moduler cette activité dans un modèle murin précoce de la maladie de Parkinson pourrait permettre d'observer cet impact sur l'agrégation progressive de l' α -synucléine et l'inflammation, qui sont des éléments clés de cette maladie neurodégénérative.

A partir des études recherchant les liens potentiels entre l'activité glucocérébrosidase, l'inflammation et l' α -synucléine, qui sont décrits dans l'introduction, différentes hypothèses étaient supposées en cas de modulation de l'activité glucocérébrosidase dans ce modèle. D'une part, l'inhibition de l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase pourrait engendrer une accumulation d' α -synucléine, une inflammation plus importante et plus rapide, ainsi qu'un développement plus rapide et plus sévère du phénotype observé progressivement dans le modèle Thy1-aSYN. D'autre part, en cas d'activation de la glucocérébrosidase, nous supposons une accumulation moins importante de l' α -synucléine, un ralentissement de l'activation du système inflammatoire, et la stabilisation ou l'amélioration des troubles moteurs et non moteurs.

1. Modulation pharmacologique par le miglustat et le conduritol- β -époxyde

Le miglustat et le CBE sont des composés pharmacologiques qui modulent l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase lysosomale. Tout d'abord, le CBE est largement utilisé *in vitro* et *in vivo* pour inhiber irréversiblement et spécifiquement l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale [Van Weely et coll., 1993]. Des études *in vitro* montrent que la glucocérébrosidase non lysosomale est également inhibée mais de façon moins importante, et avec une affinité moindre que celle pour la glucocérébrosidase lysosomale [Ridley et coll., 2013]. Dans la littérature il est admis que le CBE traverse la BHE dépendamment de l'âge des souris traitées : l'inhibition de la glucocérébrosidase cérébrale est plus importante lorsque des souris sont plus âgées car la BHE est plus perméable [Vardi et coll., 2016]. Son utilisation permet notamment d'étudier le lien entre la maladie de Gaucher et la maladie de Parkinson. Le traitement d'un modèle murin MPTP et d'un modèle murin sauvage par du CBE a entraîné une accumulation d' α -synucléine, une activation microgliale et une neurodégénérescence [Rocha et coll., 2015 ; Ginns et coll., 2014 ; Noelker et coll., 2005]. En effet, le CBE provoquerait un stress oxydant cérébral, une activation microgliale, une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une accumulation des glucocérébrosides dans les macrophages [Barkhuizen et coll., 2016].

D'autre part, le miglustat est un médicament indiqué dans le traitement de la maladie de Gaucher et de Newmann-Pick de type C. Il est également utilisé *in vivo* pour augmenter l'activité glucocérébrosidase par effet chaperon, c'est à dire en stabilisant la forme active de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Plusieurs études *in vitro* ont confirmé l'impact de la diminution de l'activité de la glucocérébrosidase sur l'accumulation d' α -synucléine. De plus, l'administration du miglustat chez différents modèles animaux de synucléinopathies est associée à une diminution de l'aggrégation de l' α -synucléine [Barkhuizen et coll., 2016]. Ces données obtenues *in vivo* et *in vitro* suscitent un intérêt à augmenter l'activité de la glucocérébrosidase chez les sujets parkinsoniens présentant une perte d'activité de cette enzyme, car ce traitement pourrait diminuer le taux d' α -synucléine cérébral, l'activation microgliale et améliorer les troubles moteurs.

Ainsi l'utilisation de ces deux composés chez ce modèle murin pourrait permettre de mieux comprendre l'impact de l'activité glucocérébrosidase sur les événements pathologiques associés aux stades précoces de la maladie de Parkinson.

2. Impact du traitement par le miglustat et le conduritol- β -époxyde sur le métabolisme de la glucocérébrosidase

Deux schémas d'administration du CBE sont proposés dans la littérature. En effet l'administration du CBE à faible dose pendant une plus longue période (< 25mg/kg) permet de mimer la perte d'activité enzymatique de la glucocérébrosidase dans la maladie de Parkinson, et le traitement par 100mg/kg/j permet de mimer une diminution de l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase dans la maladie de Gaucher. Afin d'examiner la relation entre la maladie de Gaucher et la maladie de Parkinson, la posologie de 100mg/kg/j est recommandée [Vardi et coll., 2016]. Dans notre étude, les souris sont traitées par 100 mg/kg/j de CBE et présentent une activité enzymatique de la glucocérébrosidase lysosomale cérébrale diminuée de 30 % chez les souris transgéniques et de 50 % chez les souris contrôles. L'absence de variation des taux protéiques de la glucocérébrosidase permet de renforcer l'idée que la diminution de l'activité glucocérébrosidase est liée à son activité enzymatique et non sa quantité protéique. Chez les patients parkinsoniens, une diminution de l'activité de cette enzyme est d'environ de 50 % et 30 % en présence ou non respectivement d'une mutation du gène *GBA* [Vardi et coll., 2016 ; Gegg et coll., 2012]. Les résultats obtenus dans ce modèle suggèrent que la posologie de CBE utilisée est adéquate pour moduler l'activité de la glucocérébrosidase de façon similaire de celle observée dans la maladie de Parkinson [Vardi et coll., 2016]. Le cortex sensorimoteur des souris traitées par le CBE présente un taux diminué en galactocéramides (qui sont des produits de l'enzyme) et un taux augmenté de glucosylcéramides (qui sont des substrats de l'enzyme). Ces résultats sont concordants avec les données de la littérature car il est établi que le CBE traverse la BHE et inhibe la glucocérébrosidase lysosomale cérébrale [Stephens et coll., 1981].

Une méthode de quantification du miglustat dans le cerveau des souris a été développée pendant cette étude afin de confirmer cette pharmacocinétique. Le miglustat semble traverser la BHE car il est retrouvé dans le LCR de deux patients traités pendant plus de 6 mois par cette thérapeutique, [Guitton et coll., 2009] et dans le tissu cérébral de rats traitées par gavage oral par 60mg/kg de miglustat radiomarké [Treiber et coll., 2007]. La détection de ce traitement dans un homogénat cérébral, mais également dans le cervelet et la substance noire, démontre bien que ce composé atteint le cerveau des souris. De plus, les souris traitées par le MIG ont une augmentation de l'activité glucocérébrosidase cérébrale,

sans variation du taux protéique de l'enzyme, associée à une diminution cérébrale de gangliosides GM1 (qui est un substrat de la glucocérébrosidase). Ces premières données montrent l'impact du miglustat sur l'augmentation de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale cérébrale [Treiber et coll., 2008]. A l'inverse, une augmentation du GlcCer et une diminution des GalCer, un substrat et un produit de la glucocérébrosidase, sont observées. Cette évolution peut être expliquée par l'inhibition de la glucocérérosidase non lysosomale [Ridley et coll., 2013], car un traitement à faible dose de miglustat (15mg/kg/j) est associé à une augmentation du taux cérébral de glucocérébrosides [Walden et coll., 2007].

Ces données nous démontrent que l'administration de ces différents composés pharmacologiques par voie IP a permis de moduler l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale cérébrale dans cette étude.

3. Impact sur les troubles moteurs et non moteurs des souris transgéniques

Les résultats attestent que l'administration du CBE exacerbe la perte de poids et les troubles sensorimoteurs des souris transgéniques, sans majoration des troubles de la motricité fine. Ainsi l'inhibition de la glucocérébrosidase chez ce modèle murin majore certains troubles non moteurs liés à la relation α -synucléine-glucocérébrosidase. Etant donné que notre modèle présente des troubles métaboliques et que le CBE a un impact sur la prise de poids, la voie mTOR a été étudiée dans l'hypothalamus de ces souris. Néanmoins, aucune variation n'a été détectée entre les souris traitées par CBE et PBS. Ces troubles neurosensoriels sont également détectés chez un autre modèle murin surexprimant l' α -synucléine (aSYN A53T) traité par le CBE (IP ; 100mg/kg/j ; 3 injections/semaine pendant 10 semaines). En effet, elles développent une exacerbation des troubles de la motricité fine et de la mémorisation, sans amélioration de l'activité motrice [Rockenstein et coll., 2016].

A l'inverse, l'activation de l'activité glucocérébrosidase par le miglustat ne suffit pas à elle seule à contrer les troubles non moteurs du modèle murin. Néanmoins, ce traitement entraîne une augmentation du taux cérébral de la protéine raptor chez les souris non transgéniques, et une diminution des taux cérébraux de rictor chez les souris Thy1-aSYN. Caractériser davantage le phénotype métabolique, notamment par le dosage sanguin de la leptine et l'insuline, pourrait mettre en évidence un impact du traitement par le miglustat. Dans la littérature, le modèle MPTP a été traité

par le miglustat, mais son phénotype n'a pas été étudié [Noelker et coll., 2015]. Néanmoins, le modèle Thy1-aSYN a été traité par l'AT2101, un composé à effet chaperon sur la glucocérébrosidase, à une posologie de 100mg/kg dans eau de biberon à volonté pendant 4 mois. Deux types d'administration ont été réalisés, soit le modèle 7/7 (correspondant à une alternance de 7 jours de traitement et 7 jours d'arrêt) et le modèle 3/4 (correspondant à une alternance de 3 jours de traitement et 4 jours d'arrêt). Ces deux conditions de traitement a permis d'améliorer les troubles de la coordination, mais une différence d'évolution des troubles olfactifs était observée [Richter et coll., 2014]. En effet, les troubles olfactifs étaient améliorés sous le traitement 7/7, et était similaire voire altérée par le traitement 3/4. Le traitement 7/7 entraine une activation de l'activité glucocérébrosidase plus importante que le traitement 3/4, ce qui peut impacter le phénotype de la souris. Ces données peuvent suggérer qu'un traitement de plus longue durée pourrait permettre d'améliorer les troubles de motricité fine et d'agir potentiellement sur les troubles métaboliques.

4. Impact sur l'accumulation centrale et périphérique de l' α -synucléine

Dans notre étude, aucune variation des formes α -synucléine totale, P129S et agrégée n'a été observée dans le sang et le cerveau des souris traitées par CBE. Dans la littérature, le traitement par le CBE du modèle murin aSYN A53T (100mg/jg/j, 3/sem pendant 10 semaines), MPTP et C57/Bl6 (30 mg/kg/j pendant 5 j) montre une corrélation entre l'inhibition de la glucocérébrosidase et l'accumulation d' α -synucléine au niveau cortical [Rockenstein et coll., 2016 ; Noelker et coll., 2015]. Par contre, une autre étude démontre qu'un traitement *in vitro* de cellules neuronales par du CBE pendant 7 jours ne semble pas entrainer de variation d' α -synucléine et l'élimination de ces formes oligomériques [Manning-Bog et coll., 2009]. La quantification des ces différentes formes d' α -synucléine dans le striatum permettrait de voir l'impact spécifique du CBE dans cette zone cérébrale dérégulée dans la maladie de Parkinson.

D'autre part, le traitement par miglustat dans notre étude a entrainé une diminution de l' α -synucléine total dans le sang, sans variation significative au niveau cérébral. L' α -synucléine étant exprimée dans les neurones mais également dans les réticulocytes [Barbour et coll., 2008 ; Maitta et coll., 2011], le taux d'hémoglobine a été quantifié dans ces échantillons plasmatiques. Les concentrations étant similaires entre chaque groupe, la quantification d' α -synucléine plasmatique ne semble donc

pas être biaisée par une hémolyse des échantillons. Dans la littérature, le traitement de ce modèle pendant 4 mois par l'AT2101 est responsable d'une tendance à la diminution du taux d' α -synucléine dans la substance noire [Richter et coll., 2014]. Le traitement par miglustat à plus long terme pourrait donc avoir un impact sur l'évolution de l' α -synucléine dans le cerveau des souris.

5. Impact sur l'inflammation

Le traitement par le CBE influence l'inflammation périphérique et centrale. D'une part, la population lymphocytaire T CD8+ varie différemment dans le sang selon le transgène des souris : ce taux est diminué chez les souris non transgéniques et est augmenté chez les souris transgéniques. Puis, au niveau cérébral, le CBE augmente le taux de leucocytes cérébraux uniquement chez les souris transgéniques. Ainsi l'inhibition de l'activité de la glucocérébrosidase entraîne donc une altération des lymphocytes T CD8+ sanguins et une augmentation de la population leucocytaire uniquement si une accumulation d' α -synucléine est associée. La modulation *in vivo* de la glucocérébrosidase impacterait ici le système immunitaire en cas d'accumulation d' α -synucléine. D'autre part, Rockenstein et collaborateurs ont décrit une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'activation astrocytaire en cas de traitement par le CBE chez des souris surexprimant l' α -synucléine mutée A53T. De plus, un traitement chronique par le CBE chez un modèle sans altération (C57/Bl6) augmente le taux de microglies activées [Ginns et coll., 2013]. Néanmoins dans notre étude, aucun effet traitement n'a été démontré lors de la quantification protéique de GFAP, signe de l'activation astrocytaire. Enfin, l'usage de AT2101 sur ce modèle Thy1-aSYN, entraînant une augmentation de l'activité glucocérébrosidase, est associée à une diminution de l'activation microgliale [Richter et coll., 2014] qui n'a pas été étudiée ici dans notre étude.

Ainsi il aurait été intéressant dans notre étude de quantifier l'activation microgliale. L'inhibition de la glucocérébrosidase entraîne une activation des lymphocytes cytotoxiques périphériques et une neuroinflammation. Un traitement de plus longue durée par le miglustat pourrait avoir également un impact sur l'inflammation.

V Conclusion

Cette étude a mis en exergue des troubles métaboliques chez ce modèle murin surexprimant l' α -synucléine et mimant un stade précoce de la maladie de Parkinson. Ces troubles sont décrits pour la première fois dans ce modèle de souris. Des troubles métaboliques sont également décrits dans d'autres modèles parkinsoniens, et également dans les stades précoces de la maladie de Parkinson. Ainsi le modèle Thy1-aSYN pourrait être davantage étudié afin de mieux comprendre les altérations métaboliques en cas d'accumulation d' α -synucléine dans les stades précoces de la maladie de Parkinson. De plus, a été détecté pour la première fois dans ce modèle une altération précoce des lymphocytes T CD8+ sanguins, qui sont également dérégulés dans divers modèles parkinsoniens et chez les sujets atteints de la maladie de Parkinson. Cette découverte suscite de parfaire la caractérisation de ces lymphocytes dans ce modèle, qui peut être un facteur dérégulant le système immunitaire dans la maladie.

D'une part, le traitement par le CBE inhibe l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale cérébrale et majore les troubles sensorimoteurs et inflammatoires des souris Thy1-aSYN. Ces résultats démontrent que l'inhibition de la glucocérébrosidase lysosomale suffit à exacerber *in vivo* les troubles sensorimoteurs et l'activation du système inflammatoire sans faire varier les taux d' α -synucléine totale et agrégée. Ce résultat suppose cette inhibition enzymatique peut altérer la physiopathologie de ce modèle précoce de syndrome parkinsonien sans impliquer une majoration du taux d' α -synucléine cérébral. D'autre part, un dosage cérébral du miglustat a été mis au point pour la première fois pendant cette étude. Le traitement des souris par miglustat permet une activation cérébrale de la glucocérébrosidase lysosomale et une diminution du taux plasmatique d' α -synucléine des souris transgéniques. Cependant ce traitement n'a pas d'impact sur le phénotype et le système immunitaire. Même si un traitement de plus longue durée pourrait être bénéfique dans ce modèle, ces résultats préliminaires suggèrent que l'augmentation de l'activité de la glucocérébrosidase lysosomale ne semble pas suffisante pour améliorer le phénotype et limiter l'évolution du mécanisme physiopathologique dans ce modèle murin évoquant les stades précoces de la maladie de Parkinson.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott RA, Cox M, Markus H, Tomkins A. Diet, body size and micronutrient status in Parkinson's disease. *Eur J Clin Nutr.* 1992 Dec;46(12):879-84.

Aflaki E, Moaven N, Borger DK, Lopez G, Westbroek W, Chae JJ, Marugan J, Patnaik S, Maniwang E, Gonzalez AN, Sidransky E. Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages. *Aging Cell.* 2016 Feb;15(1):77-88.

Aflaki E, Westbroek W, Sidransky E. The Complicated Relationship between Gaucher Disease and Parkinsonism: Insights from a Rare Disease. *Neuron.* 2017 Feb 22;93(4):737-746.

Aharon-Peretz J, Badarny S, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson disease: phenotype-genotype correlation. *Neurology.* 2005 Nov 8;65(9):1460-1.

Ahmed I, Liang Y, Schools S, Dawson VL, Dawson TM, Savitt JM. Development and characterization of a new Parkinson's disease model resulting from impaired autophagy. *J Neurosci.* 2012 Nov 14;32(46):16503-9.

Aiello M, Eleopra R, Rumiati RI. Body weight and food intake in Parkinson's disease. A review of the association to non-motor symptoms. *Appetite.* 2015 Jan;84:204-11.

Alam M, Mayerhofer A, Schmidt WJ. The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. *Behav Brain Res.* 2004 May 5;151(1-2):117-24.

Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Tang M-, Rosado L, Orbe Reilly M, Ruiz D, Ross B, Verbitsky M, Kisselev S, Louis E, Comella C, Colcher A, Jennings D, Nance M, Bressman S, Scott WK, Tanner C, Mickel S, Andrews H, Waters C, Fahn S, Cote L, Frucht S, Ford B, Rezak M, Novak K, Friedman JH, Pfeiffer R, Marsh L, Hiner B, Siderowf A, Payami H, Molho E, Factor S, Ottman R, Clark LN, Marder K. Cognitive performance of GBA mutation carriers with early-onset PD: the CORE-PD study. *Neurology.* 2012 May 1;78(18):1434-40.

Alcalay RN, Levy OA, Waters CC, Fahn S, Ford B, Kuo SH, Mazzoni P, Pauciulo MW, Nichols WC, Gan-Or Z, Rouleau GA, Chung WK, Wolf P, Oliva P, Keutzer J, Marder K, Zhang X. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain.* 2015 Sep;138(Pt 9):2648-58.

Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N, Cox TM. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJM.* 1997 Jan;90(1):19-25.

Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia.* 2001 Nov;36(2):165-79.

Alvarez-Erviti L, Couch Y, Richardson J, Cooper JM, Wood MJ. A-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neurosci Res.* 2011 Apr;69(4):337-42.

Amschl D, Neddens J, Havas D, Flunkert S, Rabl R, Römer H, Rockenstein E, Masliah E, Windisch M, Hutter-Paier B. Time course and progression of wild type α -synuclein accumulation in a transgenic mouse model. *BMC Neurosci.* 2013 Jan 9;14:6.

Anderson G, Noorian AR, Taylor G, Anitha M, Bernhard D, Srinivasan S, Greene JG. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2007 Sep;207(1):4-12.

Andrews ZB, Erion D, Beiler R, Liu ZW, Abizaid A, Zigman J, Elsworth JD, Savitt JM, DiMarchi R, Tschoep M, Roth RH, Gao XB, Horvath TL. Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism. *J Neurosci.* 2009 Nov 11;29(45):14057-65.

Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* 1997Jan;12(1):25-31.

Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li JY, Brundin P. Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol.* 2010 Nov;9(11):1128-38.

Antonini A, Tolosa E, Mizuno Y, Yamamoto M, Poewe WH. A reassessment of risks and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2009 Oct;8(10):929-37.

Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., Aasly, J.O., Rajput, A., Rajput, A.H., Jon Stoessel, A., Farrer, M.J., 2013. Alpha-synuclein p.H50Q: a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 28, 811–813.

Argyriou A, Dermentzaki G, Pappasilekas T, Moraitou M, Stamboulis E, Vekrellis K, Michelakakis H, Stefanis L. Increased dimerization of α -synuclein in erythrocytes in Gaucher disease and aging. *Neurosci Lett.* 2012 Oct 24;528(2):205-9.

Austin SA, Floden AM, Murphy EJ, Combs CK. A-synuclein expression modulates microglial activation phenotype. *J Neurosci.* 2006 Oct 11;26(41):10558-63.

Austin SA, Rojanathammanee L, Golovko MY, Murphy EJ, Combs CK. Lack of α -synuclein modulates microglial phenotype in vitro. *Neurochem Res.* 2011 Jun;36(6):994-1004.

Baba Y, Kuroiwa A, Uitti RJ, Wszolek ZK, Yamada T. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005 Dec;11(8):493-8. Epub 2005 Sep 9.

Baiguera C, Alghisi M, Pinna A, Bellucci A, De Luca MA, Frau L, Morelli M, Ingrassia R, Benarese M, Porrini V, Pellitteri M, Bertini G, Fabene PF, Sigala S, Spillantini MG, Liou HC, Spano PF, Pizzi M. Late-onset Parkinsonism in NF κ B/c-Rel-deficient mice. *Brain.* 2012 Sep;135(Pt 9):2750-65.

Balducci C, Pierguidi L, Persichetti E, Parnetti L, Sbaragli M, Tassi C, Orlacchio A, Calabresi P, Beccari T, Rossi A. Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2007 Jul 30;22(10):1481-4.

Ballabio A. Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009;47 Suppl 1:S34-8.

Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, Yatziv S. Cytokines in Gaucher's disease. *Eur Cytokine Netw*. 1999 Jun;10(2):205-10.

Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, Diep L, Fox M, Goldstein JM, Soriano F, Seubert P, Chilcote TJ. Red blood cells are the major source of α -synuclein in blood. *Neurodegener Dis*. 2008;5(2):55-9.

Barkhuizen M, Anderson DG, Grobler AF. Advances in GBA-associated Parkinson's disease-Pathology, presentation and therapies. *Neurochem Int*. 2016 Feb;93:6-25.

Barone P, Antonini A, Colosimo C, Marconi R, Morgante L, Avarello TP, Bottacchi E, Cannas A, Ceravolo G, Ceravolo R, Cicarelli G, Gaglio RM, Giglia RM, Iemolo F, Manfredi M, Meco G, Nicoletti A, Pederzoli M, Petrone A, Pisani A, Pontieri FE, Quatrone R, Ramat S, Scala R, Volpe G, Zappulla S, Bentivoglio AR, Stocchi F, Trianni G, Dotto PD. (2009). The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord* 24(11): 1641-9.

Bas J, Calopa M, Mestre M, Molleví DG, Cutillas B, Ambrosio S, Buendia E. Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of Parkinsonism. *J Neuroimmunol*. 2001 Feb 1;113(1):146-52.

Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1999 Mar 1;19(5):1708-16.

Beach TG, White CL 3rd, Hladik CL, Sabbagh MN, Connor DJ, Shill HA, Sue LI, Sasse J, Bachalakuri J, Henry-Watson J, Akiyama H, Adler CH; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Olfactory bulb α -synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*. 2009 Feb;117(2):169-74.

Belarbi K, Cuvelier E, Destée A, Gressier B, Chartier-Harlin MC. NADPH oxidases in Parkinson's disease: a systematic review. *Mol Neurodegener*. 2017 Nov 13;12(1):84.

Bembi B, Zambito Marsala S, Sidransky E, Ciana G, Carrozzi M, Zorzon M, Martini C, Gioulis M, Pittis MG, Capus L. Gaucher's disease with Parkinson's disease: clinical and pathological aspects. *Neurology*. 2003 Jul 8;61(1):99-101.

Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health*. 2001 Jan-Mar;16(1):1-40.

Berg D, Lang AE, Postuma RB, Maetzler W, Deuschl G, Gasser T, Siderowf A, Schapira AH, Oertel W, Obeso JA, Olanow CW, Poewe W, Stern M. Changing the research criteria for the diagnosis of Parkinson's disease: obstacles and opportunities. *Lancet Neurol*. 2013 May;12(5):514-24.

Berg D, Postuma RB, Adler CH, Bloem BR, Chan P, Dubois B, Gasser T, Goetz CG, Halliday G, Joseph L, Lang AE, Liepelt-Scarfone I, Litvan I, Marek K, Obeso J, Oertel W, Olanow CW, Poewe W, Stern M, Deuschl G. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015 Oct;30(12):1600-11.

Berridge KC, Ho CY, Richard JM, DiFeliceantonio AG. The tempted brain eats: pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain Res*. 2010 Sep 2;1350:43-64.

Besong-Agbo D, Wolf E, Jessen F, Oechsner M, Hametner E, Poewe W, Reindl M, Oertel WH, Noelker C, Bacher M, Dodel R. Naturally occurring α -synuclein autoantibody levels are lower in patients with Parkinson disease. *Neurology*. 2013 Jan 8;80(2):169-75.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000 Dec;3(12):1301-6.

Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*. 2002 Apr;24(4):308-18.

Bezard E, Przedborski S. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2011 May;26(6):993-1002.

Blandini F, Armentero MT, Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008;14 Suppl 2: S124-9.

Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*. 2012 Apr;279(7):1156-66.

Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:845618.

Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat*. 2014 Dec 15;8:155.

Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jan;8(1):57-69.

Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2001 Oct;65(2):135-72.

Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*. 1995 Dec 29;202(1-2):17-20.

Boot RG, Verhoek M, Donker-Koopman W, Strijland A, van Marle J, Overkleeft HS, Wennekes T, Aerts JM. Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):1305-12.

Boven LA, van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, Laman JD. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol*. 2004 Sep;122(3):359-69.

Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol*. 2013 Jul;15(7):713-20. Erratum in: *Nat Cell Biol*. 2013 Aug;15(8):1017.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24(2): 197-211.

Braudeau C, Graveleau J, Rimbart M, Néel A, Hamidou M, Grosbois B, Besançon A, Giraudet S, Terrien C, Josien R, Masseur A. Altered innate function of plasmacytoid dendritic cells restored by enzyme replacement therapy in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2013 Apr;50(4):281-8.

Brighina L, Prigione A, Begni B, Galbussera A, Andreoni S, Piolti R, Ferrarese C. Lymphomonocyte α -synuclein levels in aging and in Parkinson disease. *Neurobiol Aging*. 2010 May;31(5):884-5.

Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthet V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay JM, Duyckaerts C, Flavell RA, Hirsch EC, Hunot S. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest*. 2009 Jan;119(1):182-92.

Brockmann K, Hilker R, Pilatus U, Baudrexel S, Srujijes K, Magerkurth J, Hauser AK, Schulte C, Csoti I, Merten CD, Gasser T, Berg D, Hattingen E. GBA-associated PD. Neurodegeneration, altered membrane metabolism, and lack of energy failure. *Neurology*. 2012 Jul 17;79(3):213-20.

Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res*. 1999 Mar 27;823(1-2):1-10.

Buchman AS, Wilson RS, Bienias JL, Shah RC, Evans DA, Bennett DA. Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology*. 2005 Sep 27;65(6):892-7.

Burke WJ, Kumar VB, Pandey N, Panneton WM, Gan Q, Franko MW, O'Dell M, Li SW, Pan Y, Chung HD, Galvin JE. Aggregation of α -synuclein by DOPAL, the monoamine oxidase metabolite of dopamine. *Acta Neuropathol*. 2008 Feb;115(2):193-203.

Burke DG, Rahim AA, Waddington SN, Karlsson S, Enquist I, Bhatia K, Mehta A, Vellodi A, Heales S. Increased glucocerebrosidase (GBA) 2 activity in GBA1 deficient mice brains and in Gaucher leucocytes. *J Inherit Metab Dis*. 2013 Sep;36(5):869-72.

Butters TD. Gaucher disease. *Curr Opin Chem Biol*. 2007 Aug;11(4):412-8. Epub 2007 Jul 23.

Caillet-Boudin ML, Buée L, Sergeant N, Lefebvre B. Regulation of human MAPT gene expression. *Mol Neurodegener.* 2015 Jul 14;10:28.

Calabrese V, Cornelius C, Rizzarelli E, Owen JB, Dinkova-Kostova AT, Butterfield DA. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. *Antioxid Redox Signal.* 2009 Nov;11(11):2717-39.

Cali T, Ottolini D, Negro A, Brini M. α -Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *J Biol Chem.* 2012 May 25;287(22):17914-29.

Campos FL, Carvalho MM, Cristovão AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, Kim YS, Sousa N. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci.* 2013 Nov 26;7:175.

Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009 May;34(2):279-90.

Capecchi M, Petrelli M, Emanuelli B, Millevolte M, Nicolai A, Provinciali L, Ceravolo MG. Rest energy expenditure in Parkinson's disease: role of disease progression and dopaminergic therapy. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013 Feb;19(2):238-41.

Castellani RJ, Siedlak SL, Perry G, Smith MA. Sequestration of iron by Lewy bodies in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2000 Aug;100(2):111-4.

Cereda E, Barichella M, Cassani E, Caccialanza R, Pezzoli G. Clinical features of Parkinson disease when onset of diabetes came first: A case-control study. *Neurology.* 2012 May 8;78(19):1507-11

Chahine LM, Qiang J, Ashbridge E, Minger J, Yearout D, Horn S, Colcher A, Hurtig HI, Lee VM, Van Deerlin VM, Leverenz JB, Siderowf AD, Trojanowski JQ, Zabetian CP, Chen-Plotkin A. Clinical and biochemical differences in patients having Parkinson disease with vs without GBA mutations. *JAMA Neurol.* 2013 Jul;70(7):852-8.

Chang, D., Nalls, M. A., Hallgrímsdóttir, I. B., Hunkapiller, J., van der Brug, M., Cai, F., International Parkinson's Disease Genomics Consortium, 23andMe Research Team, Kerchner, G. A., Ayalon, G., Bingol, B., Sheng, M., Hinds, D., Behrens, T. W., Singleton, A. B., Bhangale, T. R., Graham, R. R. (2017). A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nature genetics*, 49(10), 1511-1516.

Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A. (2004). A-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364(9440): 1167-9.

Chartier-Harlin, M.C., Dachsel, J.C., Vilarino-Guell, C., Lincoln, S.J., Lepretre, F., Hulihan, M.M., Kachergus, J., Milnerwood, A.J., Tapia, L., Song, M.S., Le Rhun, E., Mutez, E., Larvor, L., Dufлот, A., Vanbesien-Mailliot, C., Kreisler, A., Ross, O.A., Nishioka, K., Soto-Ortolaza, A.I., Cobb, S.A., Melrose, H.L., Behrouz, B., Keeling, B.H., Bacon, J.A., Hentati, E., Williams, L., Yanagiyama, A., Sonenberg, N., Lockhart, P.J., Zubair, A.C., Uitti, R.J., Aasly, J.O., Krygowska-Wajs, A., Opala, G., Wszolek, Z.K., Frigerio, R., Maraganore, D.M., Gosal, D.,

Lynch, T., Hutchinson, M., Bentivoglio, A.R., Valente, E.M., Nichols, W.C., Pankratz, N., Foroud, T., Gibson, R.A., Hentati, F., Dickson, D.W., Destee, A., Farrer, M.J., 2011. Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 398–406.

Chen X, de Silva HA, Pettenati MJ, Rao PN, St George-Hyslop P, Roses AD, Xia Y, Horsburgh K, Uéda K, Saitoh T. The human NACP/ α -synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis. *Genomics.* 1995 Mar 20;26(2):425-7.

Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Willett WC, Ascherio A. (2003). Weight loss in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53(5): 676-9.

Chen H, Zhang SM, Hernán MA, Schwarzschild MA, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE, Ascherio A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2003 Aug;60(8):1059-64.

Chen H, Jacobs E, Schwarzschild MA, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2005 Dec;58(6):963-7.

Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol.* 2008 Jan 1;167(1):90-5.

Cheshire WP, Jr., Wszolek ZK. Body mass index is reduced early in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005. 11(1): 35-8.

Chesselet MF. In vivo α -synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp Neurol.* 2008 Jan;209(1):22-7.

Chesselet MF, Richter F, Zhu C, Magen I, Watson MB, Subramaniam SR. A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn ("Line 61") mice. *Neurotherapeutics.* 2012 Apr;9(2):297-314.

Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology.* 1997 Oct;138(10):4489-92.

Chiba, S., Matsumoto, H., Saitoh, M., Kasahara, M., Matsuya, M., Kashiwagi, M. A correlation study between serum adenosine deaminase activities and peripheral lymphocyte subsets in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 1995. 132, 170–173.

Chiurchiù V, Maccarrone M. Bioactive lipids as modulators of immunity, inflammation and emotions. *Curr Opin Pharmacol.* 2016 Aug; 29:54-62.

Chung CY, Koprach JB, Siddiqi H, Isacson O. Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV α -synucleinopathy. *J Neurosci.* 2009 Mar 18;29(11):3365-73.

Cicchetti F, Lapointe N, Roberge-Tremblay A, Saint-Pierre M, Jimenez L, Ficke BW, Gross RE. Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiol Dis.* 2005 Nov;20(2):360-71.

Cilia, R., Tunesi, S., Marotta, G., Cereda, E., Siri, C., Tesei, S., Zecchinelli, A.L., Canesi, M., Mariani, C.B., Meucci, N., Sacilotto, G., Zini, M., Barichella, M., Magnani, C., Duga S., Asselta, R., Solda, G., Seresini, A., Seia, M., Pezzoli, G., Goldwurm, S. Survival and dementia in GBA-associated Parkinson's disease: the mutation matters. *Ann. Neurol.* 2016. 80, 662–673.

Clayton DF, George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* 1998 Jun;21(6):249-54.

Clayton DF, George JM. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res.* 1999 Oct 1;58(1):120-9.

Coelho M, Ferreira JJ. Late-stage Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 435–42.

Clinicaltrials.gov (ressource électronique).

Coleman RJ, Robb SA, Lake BD, Brett EM, Harding AE. The diverse neurological features of Niemann-Pick disease type C: a report of two cases. *Mov Disord.* 1988;3(4):295-9.

Colla E, Coune P, Liu Y, Pletnikova O, Troncoso JC, Iwatsubo T, Schneider BL, Lee MK. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α -synucleinopathy in vivo. *J Neurosci.* 2012 Mar 7;32(10):3306-20.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 2001 May 24;411(6836):480-4.

Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Straathern KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet JC, Bonini NM, Lindquist S. A-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science.* 2006 Jul 21;313(5785):324-8.

Cornetta T, Palma S, Aprile I, Padua L, Tonali P, Testa A, Cozzi R. Levodopa therapy reduces DNA damage in peripheral blood cells of patients with Parkinson's disease. *Cell Biol Toxicol.* 2009 Aug;25(4):321-30.

Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev.* 2011 Oct;91(4):1161-218.

Couch Y, Alvarez-Erviti L, Sison NR, Wood MJ, Anthony DC. The acute inflammatory response to intranigral α -synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation. *J Neuroinflammation.* 2011 Nov 28;8:166.

Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nilni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. The distribution

and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003 Feb 20;37(4):649-61.

Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M.R., Luthi, A., Kim, W.T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S.B., Flavell, R.A., McCormick, D.A., De Camilli, P., 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99, 179–188.

Croisier E, Moran LB, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB. Microglial inflammation in the Parkinsonian substantia nigra: relationship to α -synuclein deposition. *J Neuroinflammation*. 2005 Jun 3;2:14.

Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. 2004 Aug 27;305(5688):1292-5.

Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*. 2014 Jan;24(1):92-104.

Cullen V, Sardi SP, Ng J, Xu YH, Sun Y, Tomlinson JJ, Kolodziej P, Kahn I, Saftig P, Woulfe J, Rochet JC, Glicksman MA, Cheng SH, Grabowski GA, Shihabuddin LS, Schlossmacher MG. Acid β -glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter α -synuclein processing. *Ann Neurol*. 2011 Jun;69(6):940-53.

Dagda, R.K., Chu, C.T., 2009. Mitochondrial quality control: insights on how Parkinson's disease related genes PINK1, parkin, and Omi/HtrA2 interact to maintain mitochondrial homeostasis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 473–479.

Dasgupta,S.,Jana,M.,Liu,X.,andPahan,K. Myelinbasicprotein- primed T cells of female but not male mice induce nitric-oxide synthase and proinflammatory cytokines in microglia: implications for gender bias in multiple sclerosis. *J. Biol. Chem.* 2005 **280**, 32609 –32617

Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*. 1998 Apr 17;273(16):9443-9.

Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron*. 2010 Jun 10;66(5):646-61.

Day BJ, Patel M, Calavetta L, Chang LY, Stamler JS. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12760-5.

Deak T, Quinn M, Cidlowski JA, Victoria NC, Murphy AZ, Sheridan JF. Neuroimmune mechanisms of stress: sex differences, developmental plasticity, and implications for pharmacotherapy of stress-related disease. *Stress*. 2015;18(4):367-80.

De Boer A, Ter Horst GJ, Lorist MM. Physiological and psychosocial age-related changes associated with reduced food intake in older persons. *Ageing Res Rev*. 2013 Jan;12(1):316-28.

- Defebvre L, Moreau C. Medical and surgical treatment of Parkinson's disease. *Presse Med.* 2017 Mar;46(2 Pt 1):218-224.
- De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide. *Mol Genet Metab.* 2013 May;109(1):93-9.
- Delgado-Camprubi, M., Esteras, N., Soutar, M.P., Plun-Favreau, H., Abramov, A.Y., 2017. Deficiency of Parkinson's disease-related gene *Fbxo7* is associated with impaired mitochondrial metabolism by PARP activation. *Cell Death Differ.* 24, 120–131.
- Del Tredici K, Rüb U, De Vos RA, Bohl JR, Braak H. Where does Parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 May;61(5):413-26.
- Demirsoy, S., Martin, S., Motamedi, S., van Veen, S., Holemans, T., Van den Haute, C., Jordanova, A., Baekelandt, V., Vangheluwe, P., Agostinis, P., 2017. *ATP13A2/PARK9* regulates endo-/lysosomal cargo sorting and proteostasis through a novel PI(3, 5)P2-mediated scaffolding function. *Hum. Mol. Genet.* 26, 1656–1669.
- Deng, H., Gao, K., Jankovic, J. The *VPS35* gene and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2013. 28, 569–575.
- Deng, H., Yuan, L. Genetic variants and animal models in SNCA and Parkinson disease. *Ageing Res.* 2014 Rev. 15, 161–176.
- Deng H, Xiu X, Jankovic J. Genetic convergence of Parkinson's disease and lysosomal storage disorders. *Mol Neurobiol.* 2015;51(3):1554-68.
- Deng H, Wang P, Jankovic J. The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res Rev.* 2018 Mar;42:72-85.
- De Pablo-Fernandez E, Courtney R, Holton JL, Warner TT. Hypothalamic α -synuclein and its relation to weight loss and autonomic symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2017 Feb;32(2):296-298.
- De Pablo-Fernández E, Breen DP, Bouloux PM, Barker RA, Foltynie T, Warner TT. Neuroendocrine abnormalities in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017 Feb;88(2):176-185.
- Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee SJ. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 4;106(31):13010-5.
- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem.* 2008 Apr 4;283(14):9089-100.
- Devos D, Moreau C, Devedjian JC, Kluza J, Petrault M, Laloux C, Jonneaux A, Ryckewaert G, Garçon G, Rouaix N, Duhamel A, Jissendi P, Dujardin K, Auger F, Ravasi L, Hopes L,

Grolez G, Firdaus W, Sablonnière B, Strubi-Vuillaume I, Zahr N, Destée A, Corvol JC, Pörtl D, Leist M, Rose C, Defebvre L, Marchetti P, Cabantchik ZI, Bordet R. Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jul 10;21(2):195-210.

Dexter DT, Wells FR, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. Increased nigral iron content in postmortem Parkinsonian brain. *Lancet*. 1987 Nov 21;2(8569):1219-20.

Di Malta C, Fryer JD, Settembre C, Ballabio A. Autophagy in astrocytes: a novel culprit in lysosomal storage disorders. *Autophagy*. 2012 Dec;8(12):1871-2.

Dickson DW, Fujishiro H, DelleDonne A, Menke J, Ahmed Z, Klos KJ, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Parisi JE, Ahlskog JE. Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2008 Apr;115(4):437-44.

Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, Dobbs SM, Weller C, Peterson DW. Association of circulating TNF- α and IL-6 with ageing and Parkinsonism. *Acta Neurol Scand*. 1999 Jul;100(1):34-41.

Dobson, R., Yarnall, A., Noyce, A. J., & Giovannoni, G. (2013). Bone health in chronic neurological diseases: a focus on multiple sclerosis and parkinsonian syndromes. *Practical Neurology*, 13(2), 70–9.

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*. 2007 Jan 30;68(5):384-6.

Double KL, Gerlach M, Schünemann V, Trautwein AX, Zecca L, Gallorini M, Youdim MB, Riederer P, Ben-Shachar D. Iron-binding characteristics of neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochem Pharmacol*. 2003 Aug 1;66(3):489-94.

Dounskaia N, Van Gemmert AW, Leis BC, Stelmach GE. Biased wrist and finger coordination in Parkinsonian patients during performance of graphical tasks. *Neuropsychologia*. 2009 Oct;47(12):2504-14.

Drouot X, Moutereau S, Nguyen JP, Lefaucheur JP, Créange A, Remy P, Goldenberg F, d'Ortho MP. Low levels of ventricular CSF orexin/hypocretin in advanced PD. *Neurology*. 2003 Aug 26;61(4):540-3.

Dryanovski DI, Guzman JN, Xie Z, Galteri DJ, Volpicelli-Daley LA, Lee VM, Miller RJ, Schumacker PT, Surmeier DJ. Calcium entry and α -synuclein inclusions elevate dendritic mitochondrial oxidant stress in dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 2013 Jun 12;33(24):10154-64.

Durrieu G, LLau ME, Rascol O, Senard JM, Rascol A, Montastruc JL. Parkinson's disease and weight loss: a study with anthropometric and nutritional assessment. *Clin Auton Res*. 1992 Jun;2(3):153-7.

Ekstrand MI, Terzioglu M, Galter D, Zhu S, Hofstetter C, Lindqvist E, Thams S, Bergstrand A, Hansson FS, Trifunovic A, Hoffer B, Cullheim S, Mohammed AH, Olson L, Larsson NG. Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 23;104(4):1325-30. Epub 2007 Jan 16.

El-Agnaf O, Overk C, Rockenstein E, Mante M, Florio J, Adame A, et al. Differential effects of immunotherapy with antibodies targeting α -synuclein oligomers and fibrils in a transgenic model of synucleinopathy. *Neurobiol Dis*. 2017;104:85–96.

Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, Alperovitch A, Tzourio C. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2009 Oct;66(4):494-504.

Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan F. Epidemiology of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)*. 2016 Jan;172(1):14-26.

Fagan, E.S., Pihlstrom, L., 2017. Genetic risk factors for cognitive decline in Parkinson's disease: a review of the literature. *Eur. J. Neurol*. 24, 520–561.

Farr SA, Banks WA, Morley JE. Effects of leptin on memory processing. *Peptides*. 2006 Jun;27(6):1420-5.

Farrer, M., Gwinn-Hardy, K., Muentner, M., DeVrieze, F.W., Crook, R., Perez-Tur, J., Lincoln, S., Maraganore, D., Adler, C., Newman, S., MacElwee, K., McCarthy, P., Miller, C., Waters, C., Hardy, J., 1999. A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum. Mol. Genet*. 8, 81–85.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*. 1991 Oct;114 (Pt 5):2283-301.

Fernagut PO, Hutson CB, Fleming SM, Tetreault NA, Salcedo J, Masliah E, Chesselet MF. (2007). Behavioral and histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: effects of α -synuclein over-expression. *Synapse* 61(12): 991-1001.

Filloux F, Townsend JJ. Pre- and postsynaptic neurotoxic effects of dopamine demonstrated by intrastriatal injection. *Exp Neurol*. 1993 Jan;119(1):79-88.

Fiszer U, Michałowska M, Baranowska B, Wolińska-Witort E, Jeske W, Jethon M, Piaścik-Gromada M, Marcinowska-Suchowierska E. Leptin and ghrelin concentrations and weight loss in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 2010 Apr;121(4):230-6.

Fleming SM, Salcedo J, Fernagut PO, Rockenstein E, Masliah E, Levine MS, Chesselet MF. Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human α -synuclein. *J Neurosci*. 2004 Oct 20;24(42):9434-40.

Fleming SM, Salcedo J, Hutson CB, Rockenstein E, Masliah E, Levine MS, Chesselet MF. Behavioral effects of dopaminergic agonists in transgenic mice overexpressing human wild-type α -synuclein. *Neuroscience*. 2006 Nov 3;142(4):1245-53.

Fleming SM, Tetreault NA, Mulligan CK, Hutson CB, Masliah E, Chesselet MF. Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype α -synuclein. *Eur J Neurosci*. 2008 Jul;28(2):247-56.

Fleming SM. Mechanisms of Gene-Environment Interactions in Parkinson's Disease. *Curr Environ Health Rep*. 2017 Jun;4(2):192-199.

Foley TD, Petro LA, Stredny CM, Coppa TM. Oxidative inhibition of protein phosphatase 2A activity: role of catalytic subunit disulfides. *Neurochem Res*. 2007 Nov;32(11):1957-64.

Foo JN, Liany H, Bei JX, Yu XQ, Liu J, Au WL, Prakash KM, Tan LC, Tan EK. Rare lysosomal enzyme gene SMPD1 variant (p.R591C) associates with Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2013 Dec;34(12):2890.e13-5.

Forno LS. Concentric hyalin intraneuronal inclusions of Lewy type in the brains of elderly persons (50 incidental cases): relationship to Parkinsonism. *J Am Geriatr Soc*. 1969 Jun;17(6):557-75.

Fortin DL, Nemani VM, Voglmaier SM, Anthony MD, Ryan TA, Edwards RH. Neural activity controls the synaptic accumulation of α -synuclein. *J Neurosci*. 2005 Nov 23;25(47):10913-21.

Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener*. 2009 Nov 16;4:47.

Freeman D, Cedillos R, Choyke S, Lukic Z, McGuire K, Marvin S, Burrage AM, Sudholt S, Rana A, O'Connor C, Wiethoff CM, Campbell EM. A-synuclein induces lysosomal rupture and cathepsin dependent reactive oxygen species following endocytosis. *PLoS One*. 2013 Apr 25;8(4):e62143.

Freichel C, Neumann M, Ballard T, Müller V, Woolley M, Ozmen L, Borroni E, Kretzschmar HA, Haass C, Spooen W, Kahle PJ. Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in α -synuclein transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2007 Sep;28(9):1421-35.

Friedman LG, Lachenmayer ML, Wang J, He L, Poulouse SM, Komatsu M, Holstein GR, Yue Z. Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of α -synuclein and LRRK2 in the brain. *J Neurosci*. 2012 May 30;32(22):7585-93.

Fujikake N, Shin M, Shimizu S. Association Between Autophagy and Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci*. 2018 May 22; 12:255.

Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. (2002). α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4(2): 160-4.

Fulop T, Larbi A, Witkowski JM, McElhaney J, Loeb M, Mitnitski A, Pawelec G. Aging, frailty and age-related diseases. *Biogerontology*. 2010 Oct;11(5):547-63.

Funayama, M., Ohe, K., Amo, T., Furuya, N., Yamaguchi, J., Saiki, S., Li, Y., Ogaki, K., Ando, M., Yoshino, H., Tomiyama, H., Nishioka, K., Hasegawa, K., Saiki, H., Satake, W., Mogushi, K., Sasaki, R., Kokubo, Y., Kuzuhara, S., Toda, T., Mizuno, Y., Uchiyama, Y., Ohno, K., Hattori, N., 2015. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol.* 14, 274–282.

Gahete MD, Rubio A, Cordoba-Chacon J, Gracia-Navarro F, Kineman RD, Avila J, Luque RM, Castano JP (2010) Expression of the ghrelin and neurotensin systems is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 22(3):819–828.

Gan-Or Z, Ozelius LJ, Bar-Shira A, Saunders-Pullman R, Mirelman A, Kornreich R, Gana-Weisz M, Raymond D, Rozenkrantz L, Deik A, Gurevich T, Gross SJ, Schreiber-Agus N, Giladi N, Bressman SB, Orr-Urtreger A. The p.L302P mutation in the lysosomal enzyme gene SMPD1 is a risk factor for Parkinson disease. *Neurology.* 2013 Apr 23;80(17):1606-10.

Gan-Or, Z., Amshalom, I., Kilarski, L.L., Bar-Shira, A., Gana-Weisz, M., Mirelman, A., Marder, K., Bressman, S., Giladi, N., Orr-Urtreger, A., 2015. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. *Neurology* 84, 880–887.

Gao HM, Kotzbauer PT, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuroinflammation and oxidation/nitration of α -synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci.* 2008 Jul 23;28(30):7687-98.

Gautier CA, Kitada T, Shen J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Aug 12;105(32):11364-9.

Gegg ME, Burke D, Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, Schapira AH. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of Parkinson disease brains. *Ann Neurol.* 2012 Sep;72(3):455-63.

Gegg ME, Sweet L, Wang BH, Shihabuddin LS, Sardi SP, Schapira AH. No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations. *Mov Disord.* 2015 Jul;30(8):1085-9.

George JM. The synucleins. *Genome Biol.* 2002;3(1): REVIEWS3002.

Gérard JM. Initial management and adaptation of Parkinson's disease treatment. *Rev Med Brux.* 2008 Sep;29(4):229-31.

Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2006 Feb;21(2):404-12.

Ghidoni R, Trinchera M, Sonnino S, Chigorno V, Tettamanti G. The sialic acid residue of exogenous GM1 ganglioside is recycled for biosynthesis of sialoglycoconjugates in rat liver. *Biochem J.* 1987 Oct 1;247(1):157-64.

- Glajch KE, Fleming SM, Surmeier DJ, Osten P. Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2012 May 1;230(2):309-16.
- Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuronal α -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α -synuclein. *Neuron.* 2002 May 16;34(4):521-33.
- Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1988 Jun;51(6):745-52.
- Ginns EI, Mak SK, Ko N, Karlgren J, Akbarian S, Chou VP, Guo Y, Lim A, Samuelsson S, LaMarca ML, Vazquez-DeRose J, Manning-Boğ AB. Neuroinflammation and α -synuclein accumulation in response to glucocerebrosidase deficiency are accompanied by synaptic dysfunction. *Mol Genet Metab.* 2014 Feb;111(2):152-62.
- Goedert M. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science.* 2015 Aug 7;349(6248):1255-55.
- Goker-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca ME, Nussbaum RL, McInerney-Leo A, Sidransky E. Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *J Med Genet.* 2004 Dec;41(12):937-40.
- Goker-Alpan O, Giasson BI, Eblan MJ, Nguyen J, Hurtig HI, Lee VM, Trojanowski JQ, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations are an important risk factor for Lewy body disorders. *Neurology.* 2006 Sep 12;67(5):908-10.
- Goker-Alpan O, Stubblefield BK, Giasson BI, Sidransky E. Glucocerebrosidase is present in α -synuclein inclusions in Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 2010 Nov;120(5):641-9.
- Goker-Alpan O, Masdeu JC, Kohn PD, Ianni A, Lopez G, Groden C, Chapman MC, Cropp B, Eisenberg DP, Maniwang ED, Davis J, Wiggs E, Sidransky E, Berman KF. The neurobiology of glucocerebrosidase-associated Parkinsonism: a positron emission tomography study of dopamine synthesis and regional cerebral blood flow. *Brain.* 2012 Aug;135(Pt 8):2440-8.
- Gomez-Muñoz A, Presa N, Gomez-Larauri A, Rivera IG, Trueba M, Ordoñez M. Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Prog Lipid Res.* 2016 Jan;61:51-62.
- Gómez-Suaga P, Hilfiker S. LRRK2 as a modulator of lysosomal calcium homeostasis with downstream effects on autophagy. *Autophagy.* 2012 Apr;8(4):692-3.
- Good CH, Hoffman AF, Hoffer BJ, Chefer VI, Shippenberg TS, Bäckman CM, Larsson NG, Olson L, Gellhaar S, Galter D, Lupica CR. Impaired nigrostriatal function precedes behavioral deficits in a genetic mitochondrial model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 2011 Apr;25(4):1333-44.
- Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010 May 28;32(5):593-604.

Gorell JM, Ordidge RJ, Brown GG, Deniau JC, Buderer NM, Helpers JA. Increased iron-related MRI contrast in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurology*. 1995 Jun;45(6):1138-43. Erratum in: *Neurology* 1995 Jul;45(7):1420.

Gosavi N, Lee HJ, Lee JS, Patel S, Lee SJ. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar α -synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. *J Biol Chem*. 2002 Dec 13;277(50):48984-92.

Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE, Pahan K. Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 20;104(47):18754-9. Epub 2007 Nov 13.

Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*. 2008 Oct 4;372(9645):1263-71.

Grassi S, Chiricozzi E, Mauri L, Sonnino S, Prinetti A. Sphingolipids and neuronal degeneration in lysosomal storage disorders. *J Neurochem*. 2018 Jun 30.

Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Brüning JC. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci*. 2005 Oct;8(10):1289-91.

Guerreiro PS, Coelho JE, Sousa-Lima I, Macedo P, Lopes LV, Outeiro TF, Pais TF. Mutant A53T α -Synuclein Improves Rotarod Performance Before Motor Deficits and Affects Metabolic Pathways. *Neuromolecular Med*. 2017 Mar;19(1):113-121.

Guitton J, Coste S, Guffon-Fouilhoux N, Cohen S, Manchon M, Guillaumont M. Rapid quantification of miglustat in human plasma and cerebrospinal fluid by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009 Jan 15;877(3):149-54.

Haehner A, Hummel T, Reichmann H. Olfactory dysfunction as a diagnostic marker for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*. 2009 Dec;9(12):1773-9.

Hailemariam TK, Huan C, Liu J, Li Z, Roman C, Kalbfleisch M, Bui HH, Peake DA, Kuo MS, Cao G, Wadgaonkar R, Jiang XC. Sphingomyelin synthase 2 deficiency attenuates NFkappaB activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Aug;28(8):1519-26.

Haissaguerre M, Saucisse N, Cota D. Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Nov;397(1-2):67-77.

Halliday G, Herrero MT, Murphy K, McCann H, Ros-Bernal F, Barcia C, Mori H, Blesa FJ, Obeso JA. No Lewy pathology in monkeys with over 10 years of severe MPTP Parkinsonism. *Mov Disord*. 2009 Jul 30;24(10):1519-23.

Han M, Nagele E, DeMarshall C, Acharya N, Nagele R. Diagnosis of Parkinson's disease based on disease-specific autoantibody profiles in human sera. *PLoS One*. 2012;7(2):e32383.

Handa K, Hakomori SI. Carbohydrate to carbohydrate interaction in development process and cancer progression. *Glycoconj J*. 2012 Dec;29(8-9):627-37.

Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides. *J Biol Chem*. 2011 Aug 12;286(32):27855-62.

Harms AS, Cao S, Rowse AL, Thome AD, Li X, Mangieri LR, Cron RQ, Shacka JJ, Raman C, Standaert DG. MHCII is required for α -synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci*. 2013 Jun 5;33(23):9592-600.

Harms AS, Thome AD, Yan Z, Schonhoff AM, Williams GP, Li X, Liu Y, Qin H, Benveniste EN, Standaert DG. Peripheral monocyte entry is required for alpha-Synuclein induced inflammation and Neurodegeneration in a model of Parkinson disease. *Exp Neurol*. 2018 Feb;300:179-187.

Harvey J. Leptin regulation of neuronal morphology and hippocampal synaptic function. *Front Synaptic Neurosci*. 2013 Aug 6;5:3.

HAS. Guide du parcours de soins « Maladie de Parkinson ». 2012

Hastings TG, Lewis DA, Zigmond MJ. Reactive dopamine metabolites and neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol*. 1996;387:97-106.

Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Jul;1170:615-22.

Hays NP, Roberts SB. The anorexia of aging in humans. *Physiol Behav*. 2006 Jun 30;88(3):257-66.

Hegyi K, Fülöp K, Kovács K, Tóth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int*. 2004;28(3):159-69.

Henrich MT, Geibl FF, Lee B, Chiu WH, Koprach JB, Brotchie JM, Timmermann L, Decher N, Matschke LA, Oertel WH. A53T- α -synuclein overexpression in murine locus coeruleus induces Parkinson's disease-like pathology in neurons and glia. *Acta Neuropathol Commun*. 2018 May 10;6(1):39.

Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Jan 18;13(2):89-102.

Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*. 2009 Apr;8(4):382-97.

Hisanaga, K., Asagi, M., Itoyama, Y., Iwasaki, Y. Increase in peripheral CD4 bright+ CD8 dull+ T cells in Parkinson disease. *Arch. Neurol*. 2001. 58, 1580–1583.

Hisata J., Lake and stream rehabilitation: rotenone use and health risks. Final supplemental environmental impact statement, Washington State Department of Fish and Wildlife, 2002.

Hla T. Sphingosine 1-phosphate receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2001 Apr;64(1-4):135-42.

Hodara R, Norris EH, Giasson BI, Mishizen-Eberz AJ, Lynch DR, Lee VM, Ischiropoulos H. Functional consequences of α -synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):47746-53.

Hoenen C, Gustin A, Birck C, Kirchmeyer M, Beaume N, Felten P, Grandbarbe L, Heuschling P, Heurtaux T. Alpha-Synuclein Proteins Promote Pro-Inflammatory Cascades in Microglia: Stronger Effects of the A53T Mutant. *PLoS One.* 2016 Sep 13;11(9):e0162717.

Holemans, T., Sorensen, D.M., van Veen, S., Martin, S., Hermans, D., Kemmer, G.C., Van den Haute, C., Baekelandt, V., Gunther, P.T., Agostinis, P., Wuytack, F., Palmgren, M., Eggermont, J., Vangheluwe, P., 2015. A lipid switch unlocks Parkinson's disease-associated ATP13A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 9040–9045.

Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat.* 2008 May;29(5):567-83.

Hughes DA, Pastores GM. Haematological manifestations and complications of Gaucher disease. *Curr Opin Hematol.* 2013 Jan;20(1):41-7.

Hunot S, Boissière F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 1996 May;72(2):355-63.

Ikeda T, Nagata K, Shono T, Narahashi T. Dieldrin and picrotoxinin modulation of GABA(A) receptor single channels. *Neuroreport.* 1998 Oct 5;9(14):3189-95.

Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol.* 2003 Dec;106(6):518-26.

Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H, Yanagida T, Takata K, Kobayashi Y, Taniguchi T, Yoshimoto K, Kaneko M, Okuma Y, Taira T, Ariga H, Shimohama S. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *J Neurochem.* 2007 Jun;101(6):1491-1504.

Inokuchi J. Membrane microdomains and insulin resistance. *FEBS Lett.* 2010 May 3;584(9):1864-71.

Inokuchi J, Nagafuku M, Ohno I, Suzuki A. Distinct selectivity of gangliosides required for CD4⁺ T and CD8⁺ T cell activation. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jan;1851(1):98-106.

INRS, Tableau des maladies professionnelles n° 58 créée par le décret n° 2012-665 du 4 mai 2012.

Inzelberg R, Korczyn AD. Parkinsonism in adult-onset GM2 gangliosidosis. *Mov Disord*. 1994 May;9(3):375-7.

Ip CW, Beck SK, Volkmann J. Lymphocytes reduce nigrostriatal deficits in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015 Dec;122(12):1633-43.

Iranzo A, Santamaría J, Rye DB, Valldeoriola F, Martí MJ, Muñoz E, Vilaseca I, Tolosa E. Characteristics of idiopathic REM sleep behavior disorder and that associated with MSA and PD. *Neurology*. 2005 Jul 26;65(2):247-52.

Iranzo A, Molinuevo JL, Santamaría J, Serradell M, Martí MJ, Valldeoriola F, Tolosa E. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *Lancet Neurol*. 2006 Jul;5(7):572-7.

Iravani MM, Syed E, Jackson MJ, Johnston LC, Smith LA, Jenner P. A modified MPTP treatment regime produces reproducible partial nigrostriatal lesions in common marmosets. *Eur J Neurosci*. 2005 Feb;21(4):841-54.

Itier JM, Ibanez P, Mena MA, Abbas N, Cohen-Salmon C, Bohme GA, Laville M, Pratt J, Corti O, Pradier L, Ret G, Joubert C, Periquet M, Araujo F, Negroni J, Casarejos MJ, Canals S, Solano R, Serrano A, Gallego E, Sanchez M, Deneffe P, Benavides J, Tremp G, Rooney TA, Brice A, Garcia de Yebenes J. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet*. 2003 Sep 15;12(18):2277-91.

Jackson DM, Westlind-Danielsson A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther* 1994; 64: 291- 369.

Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Apr;82(7):2173-7.

Jeyakumar M, Butters TD, Cortina-Borja M, Hunnam V, Proia RL, Perry VH, Dwek RA, Platt FM. Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 25;96(11):6388-93.

Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-8.

Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. 1996 Dec;47(6 Suppl 3):S161-70.

Jia F, Wagle Shukla A, Hu W, Almeida L, Holanda V, Zhang J, Meng F, Okun MS, Li L. Deep Brain Stimulation at Variable Frequency to Improve Motor Outcomes in Parkinson's Disease. *Mov Disord Clin Pract*. 2018 Oct 1;5(5):538-541.

Jo E, McLaurin J, Yip CM, St George-Hyslop P, Fraser PE. α -Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34328-34.

Josephs KA, Matsumoto JY, Lindor NM. Heterozygous Niemann-Pick disease type C presenting with tremor. *Neurology*. 2004 Dec 14;63(11):2189-90.

Józefowski S, Czerkies M, Łukasik A, Bielawska A, Bielawski J, Kwiatkowska K, Sobota A. Ceramide and ceramide 1-phosphate are negative regulators of TNF- α production induced by lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2010 Dec 1;185(11):6960-73.

Kachroo A, Irizarry MC, Schwarzschild MA. Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. *Exp Neurol*. 2010 Jun;223(2):657-61.

Kain L, Webb B, Anderson BL, Deng S, Holt M, Costanzo A, Zhao M, Self K, Teyton A, Everett C, Kronenberg M, Zajonc DM, Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The identification of the endogenous ligands of natural killer T cells reveals the presence of mammalian α -linked glycosylceramides. *Immunity*. 2014 Oct 16;41(4):543-54. Erratum in: *Immunity*. 2014 Nov 20;41(5):867.

Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Haass C. Physiology and pathophysiology of α -synuclein. Cell culture and transgenic animal models based on a Parkinson's disease-associated protein. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;920:33-41.

Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RK. Controversies over the staging of α -synuclein pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2008 Jul;116(1):125-8; author reply 129-31.

Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*. 2015 Aug 29;386(9996):896-912.

Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S., Fidani, L., The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. *Acta Neurol. Scand*. 2016 134, 314–326.

Kang S, Heo TH, Kim SJ. Altered levels of α -synuclein and sphingolipids in Batten disease lymphoblast cells. *Gene*. 2014 Apr 15;539(2):181-5.

Kang, U.B., Marto, J.A., 2017. Leucine-rich repeat kinase 2 and Parkinson's disease. *Proteomics* 17.

Kannarkat GT, Boss JM, Tansey MG. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2013;3(4):493-514.

Kapogiannis D, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Biragyn A, Masharani U, Frassetto L, Petersen RC, Miller BL, Goetzl EJ. Dysfunctionally phosphorylated type 1 insulin receptor substrate in neural-derived blood exosomes of preclinical Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2015 Feb;29(2):589-96.

Kaur B, Prakash A. Ceftriaxone attenuates glutamate-mediated neuro-inflammation and restores BDNF in MPTP model of Parkinson's disease in rats. *Pathophysiology*. 2017 Jun;24(2):71-79.

Khurana V, Lu Y, Steinhilb ML, Oldham S, Shulman JM, Feany MB. TOR-mediated cell-cycle activation causes neurodegeneration in a Drosophila tauopathy model. *Curr Biol*. 2006 Feb 7;16(3):230-41.

Kiely, A.P., Asi, Y.T., Kara, E., Limousin, P., Ling, H., Lewis, P., Proukakis, C., Quinn, N., Lees, A.J., Hardy, J., Revesz, T., Houlden, H., Holton, J.L., 2013. Alpha-synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol*. 125, 753–769.

Kiely, A.P., Ling, H., Asi, Y.T., Kara, E., Proukakis, C., Schapira, A.H., Morris, H.R., Roberts, H.C., Lubbe, S., Limousin, P., Lewis, P.A., Lees, A.J., Quinn, N., Hardy, J., Love, S., Revesz, T., Houlden, H., Holton, J.L., 2015. Distinct clinical and neuropathological features of G51D SNCA mutation cases compared with SNCA duplication and H50Q mutation. *Mol Neurodegener*. 10, 41.

Kim S, Jeon BS, Heo C, Im PS, Ahn TB, Seo JH, Kim HS, Park CH, Choi SH, Cho SH, Lee WJ, Suh YH. A-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. *FASEB J*. 2004 Oct;18(13):1615-7.

Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, Wakeham A, You-Ten AJ, Kalia SK, Horne P, Westaway D, Lozano AM, Anisman H, Park DS, Mak TW. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 5;102(14):5215-20.

Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 1;81(3):302-13.

Kim YS, Laurine E, Woods W, Lee SJ. A novel mechanism of interaction between α -synuclein and biological membranes. *J Mol Biol*. 2006 Jul 7;360(2):386-97. Epub 2006 May 17.

Kinghorn, K.J., Castillo-Quan, J.I., Bartolome, F., Angelova, P.R., Li, L., Pope, S., Cocheme, H.M., Khan, S., Asghari, S., Bhatia, K.P., Hardy, J., Abramov, A.Y., Partridge, L., 2015. Loss of PLA2G6 leads to elevated mitochondrial lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. *Brain* 138, 1801–1816.

Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, Mandel RJ, Björklund A. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of α -synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci*. 2002 Apr 1;22(7):2780-91.

Kirik D, Björklund A. Modeling CNS neurodegeneration by overexpression of disease-causing proteins using viral vectors. *Trends Neurosci*. 2003 Jul;26(7):386-92.

Kistner A, Lhommée E, Krack P. Mechanisms of body weight fluctuations in Parkinson's disease. *Front Neurol*. 2014 Jun 2;5:84.

Klegeris A, Pelech S, Giasson BI, Maguire J, Zhang H, McGeer EG, McGeer PL. A-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiol Aging*. 2008 May;29(5):739-52.

Kluenemann HH, Nutt JG, Davis MY, Bird TD. Parkinsonism syndrome in heterozygotes for Niemann-Pick C1. *J Neurol Sci.* 2013 Dec 15;335(1-2):219-20.

Kmiec Z, Pokrywka L, Kotlarz G, Kubasik J, Szutowicz A, Mysliwski A. Effects of fasting and refeeding on serum leptin, adiponectin and free fatty acid concentrations in young and old male rats. *Gerontology.* 2005 Nov-Dec;51(6):357-62.

Kocalis HE, Hagan SL, George L, Turney MK, Siuta MA, Laryea GN, Morris LC, Muglia LJ, Printz RL, Stanwood GD, Niswender KD. Rictor/mTORC2 facilitates central regulation of energy and glucose homeostasis. *Mol Metab.* 2014 Feb 19;3(4):394-407.

Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:81-103.

Konno, T., Ross, O.A., Puschmann, A., Dickson, D.W., Wszolek, Z.K., 2016. Autosomal dominant Parkinson's disease caused by SNCA duplications. *Parkinsonism Relat. Disord.* 22 (Suppl. 1), S1–S6.

Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med.* 2008 May;14(5):504-6.

Körschen HG, Yildiz Y, Raju DN, Schonauer S, Bönigk W, Jansen V, Kremmer E, Kaupp UB, Wachten D. The non-lysosomal β -glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi. *J Biol Chem.* 2013 Feb 1;288(5):3381-93.

Koziorowski D, Tomasiuk R, Szlufik S, Friedman A. Inflammatory cytokines and NT-proCNP in Parkinson's disease patients. *Cytokine.* 2012 Dec;60(3):762-6.

Kraoua I, Stirnemann J, Ribeiro MJ, Rouaud T, Verin M, Annic A, Rose C, Defebvre L, Réménieras L, Schüpbach M, Belmatoug N, Vidailhet M, Sedel F. Parkinsonism in Gaucher's disease type 1: ten new cases and a review of the literature. *Mov Disord.* 2009 Jul 30;24(10):1524-30.

Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schöls, L., Riess, O., 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18, 106–108.

Krüger R, Kuhn W, Leenders KL, Sprengelmeyer R, Müller T, Voitalla D, Portman AT, Maguire RP, Veenma L, Schröder U, Schöls L, Epplen JT, Riess O, Przuntek H. Familial Parkinsonism with synuclein pathology: clinical and PET studies of A30P mutation carriers. *Neurology.* 2001 May 22;56(10):1355-62.

Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res.* 2003 Oct 29;531(1-2):81-92.

Kumar R, Jangir DK, Verma G, Shekhar S, Hanpude P, Kumar S, Kumari R, Singh N, Sarovar Bhavesh N, Ranjan Jana N, Kanti Maiti T. S-nitrosylation of UCHL1 induces its structural instability and promotes α -synuclein aggregation. *Sci Rep*. 2017 Mar 16;7:44558.

Kuranuki S, Arai C, Terada S, Aoyama T, Nakamura T. Possible regulatory factors for intra-abdominal fat mass in a rat model of Parkinson's disease. *Nutrition*. 2011 Feb;27(2):239-43.

Kurkowska-Jastrzebska I, Wrońska A, Kohutnicka M, Członkowski A, Członkowska A. MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 1999;59(1):1-8.

Kwakye GF, Paoliello MM, Mukhopadhyay S, Bowman AB, Aschner M. Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease: Shared and Distinguishable Features. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Jul 6;12(7):7519-40.

Kwon O, Kim KW, Kim MS. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Apr;73(7):1457-77.

Lam HA, Wu N, Cely I, Kelly RL, Hean S, Richter F, Magen I, Cepeda C, Ackerson LC, Walwyn W, Masliah E, Chesselet MF, Levine MS, Maidment NT. Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human α -synuclein. *J Neurosci Res*. 2011 Jul;89(7):1091-102.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983 Feb 25;219(4587):979-80.

Langston JW, Langston EB, Irwin I. MPTP-induced Parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1984;100:49-54.

Laplante M, Sabatini DM. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol*. 2009 Dec 1;19(22):R1046-52.

Larsen KE, Schmitz Y, Troyer MD, Mosharov E, Dietrich P, Quazi AZ, Savalle M, Nemani V, Chaudhry FA, Edwards RH, Stefanis L, Sulzer D. A-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J Neurosci*. 2006 Nov 15;26(46):11915-22.

Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, Lansbury PT Jr. A-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol*. 2002 Oct 4;322(5):1089-102.

Lauwers E, Debyser Z, Van Dorpe J, De Strooper B, Nuttin B, Baekelandt V. Neuropathology and neurodegeneration in rodent brain induced by lentiviral vector-mediated overexpression of α -synuclein. *Brain Pathol*. 2003 Jul;13(3):364-72.

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1990;39(1):151-70.

Ledeen RW, Wu G, André S, Bleich D, Huet G, Kaltner H, Kopitz J, Gabius HJ. Beyond glycoproteins as galectin counterreceptors: tumor-effector T cell growth control via ganglioside GM1 [corrected]. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Apr;1253:206-21.

Lee JJ, Oh JS, Ham JH, Lee DH, Lee I, Sohn YH, Kim JS, Lee PH. Association of body mass index and the depletion of nigrostriatal dopamine in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2016 Feb;38:197-204.

Leech RW, Shuman RM, Putnam WD, Rance F, Jewett TT. Gaucher's disease: a case history with extensive lipid storage in the brain. *Am J Clin Pathol.* 1985 Apr;83(4):516-9.

Leentjens AF, Van den Akker M, Metsemakers JF, Lousberg R, Verhey FR. Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: a register study. *Mov Disord.* 2003 Apr;18(4):414-8.

Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet.* 2009 Jun 13;373(9680):2055-66.. Erratum in: *Lancet.* 2009 Aug 29;374(9691):684.

Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honoré, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Dürr, A., Melki, R., Verny, C., Brice, A., G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann. Neurol.* 2013. 73, 459–471.

Lesage, S., Drouet, V., Majounie, E., Deramecourt, V., Jacoupy, M., Nicolas, A., Cormier-Dequaire, F., Hassoun, S.M., Pujol, C., Ciura, S., Erpapazoglou, Z., Usenko, T., Maurage, C.A., Sahbatou, M., Liebau, S., Ding, J., Bilgic, B., Emre, M., Erginel-Unaltuna, N., Guven, G., Tison, F., Tranchant, C., Vidailhet, M., Corvol, J.C., Krack, P., Leutenegger, A.L., Nalls, M.A., Hernandez, D.G., Heutink, P., Gibbs, J.R., Hardy, J., Wood, N.W., Gasser, T., Dürr, A., Deleuze, J.F., Tazir, M., Destee, A., Lohmann, E., Kabashi, E., Singleton, A., Corti, O., Brice, A., 2016. Loss of VPS13C function in autosomal-recessive parkinsonism causes mitochondrial dysfunction and increases PINK1/Parkin-dependent mitophagy. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 500–513.

Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehncrona S, Björklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med.* 2008 May;14(5):501-3.

Li X, Patel JC, Wang J, Avshalumov MV, Nicholson C, Buxbaum JD, Elder GA, Rice ME, Yue Z. Enhanced striatal dopamine transmission and motor performance with LRRK2 overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S. *J Neurosci.* 2010 Feb 3;30(5):1788-97.

Li, N.N., Wang, L., Tan, E.K., Cheng, L., Sun, X.Y., Lu, Z.J., Li, J.Y., Zhang, J.H., Peng, R., Genetic analysis of CHCHD2 gene in Chinese Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2016. 171, 1148–1152.

Lin DS, Lin SP, Liang DC, Ho CS, Wu MC. Technetium-99m-HmPAO brain SPECT in infantile Gaucher's disease. *Pediatr Neurol.* 1999 Jan;20(1):66-9.

Lin HV, Plum L, Ono H, Gutiérrez-Juárez R, Shanabrough M, Borok E, Horvath TL, Rossetti L, Accili D. Divergent regulation of energy expenditure and hepatic glucose production by insulin receptor in agouti-related protein and POMC neurons. *Diabetes*. 2010 Feb;59(2):337-46.

Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol*. 2004 Feb;5(2):133-9.

Lipina C, Hundal HS. Ganglioside GM3 as a gatekeeper of obesity-associated insulin resistance: Evidence and mechanisms. *FEBS Lett*. 2015 Oct 24;589(21):3221-7.

Liu JP, Tang Y, Zhou S, Toh BH, McLean C, Li H. Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Neurosci*. 2010 Jan;43(1):33-42.

Lo Bianco C, Ridet JL, Schneider BL, Deglon N, Aebischer P. α -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10813-8.

Longo F, Russo I, Shimshek DR, Greggio E, Morari M. Genetic and pharmacological evidence that G2019S LRRK2 confers a hyperkinetic phenotype, resistant to motor decline associated with aging. *Neurobiol Dis*. 2014 Nov;71:62-73.

Lopez PH, Schnaar RL. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 Oct;19(5):549-57.

Lorefalt B, Ganowiak W, Palhagen S, Toss G, Unosson M, Granerus AK. (2004). Factors of importance for weight loss in elderly patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 110(3): 180-7.

Lorefält B, Toss G, Granérus AK. Weight loss, body fat mass, and leptin in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2009 Apr 30;24(6):885-90.

Lou H, Montoya SE, Alerte TN, Wang J, Wu J, Peng X, Hong CS, Friedrich EE, Mader SA, Pedersen CJ, Marcus BS, McCormack AL, Di Monte DA, Daubner SC, Perez RG. Serine 129 phosphorylation reduces the ability of α -synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2010 Jun 4;285(23):17648-61.

Lu JV, Walsh CM. Programmed necrosis and autophagy in immune function. *Immunol Rev*. 2012 Sep;249(1):205-17.

Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM. Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. *J Exp Med*. 2012 May 7;209(5):975-86.

Lusk G. Animal calorimetry analysis of the oxidation of mixtures of carbohydrate and fat. A correction. *J Biol Chem* 59: 41–42, 1924.

Lykkebo S, Jensen PH. A-synuclein and presynaptic function: implications for Parkinson's disease. *Neuromolecular Med*. 2002;2(2):115-29.

- Maceyka M, Spiegel S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*. 2014 Jun 5;510(7503):58-67.
- Machaczka M, Rucinska M, Skotnicki AB, Jurczak W. Parkinson's syndrome preceding clinical manifestation of Gaucher's disease. *Am J Hematol*. 1999 Jul;61(3):216-7.
- Machaczka M, Klimkowska M, Regenthal S, Hägglund H. Gaucher disease with foamy transformed macrophages and erythrophagocytic activity. *J Inher Metab Dis*. 2011 Feb;34(1):233-5.
- Maitta RW, Wolgast LR, Wang Q, Zhang H, Bhattacharyya P, Gong JZ, Sunkara J, Albanese JM, Pizzolo JG, Cannizzaro LA, Ramesh KH, Ratech H. A- and beta-synucleins are new diagnostic tools for acute erythroid leukemia and acute megakaryoblastic leukemia. *Am J Hematol*. 2011 Feb;86(2):230-4.
- Malnar M, Hecimovic S, Mattsson N, Zetterberg H. Bidirectional links between Alzheimer's disease and Niemann-Pick type C disease. *Neurobiol Dis*. 2014 Dec;72 Pt A:37-47.
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of α -synuclein in mice: paraquat and α -synuclein. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):1641-4.
- Manning-Boğ AB, Schüle B, Langston JW. A-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: a biological link between Gaucher disease and Parkinsonism. *Neurotoxicology*. 2009 Nov;30(6):1127-32.
- Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C; Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. Collaborative analysis of α -synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA*. 2006 Aug 9;296(6):661-70.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Martín-Oliva D, Navascués J. Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol*. 2011 Feb;7(1):25-40.
- Marion MH, Qurashi M, Marshall G, Foster O. Is REM sleep behaviour disorder (RBD) a risk factor of dementia in idiopathic Parkinson's disease? *J Neurol*. 2008 Feb;255(2):192-6.
- Markus HS, Cox M, Tomkins AM. Raised resting energy expenditure in Parkinson's disease and its relationship to muscle rigidity. *Clin Sci (Lond)*. 1992 Aug;83(2):199-204.
- Markus HS, Tomkins AM, Stern GM. Increased prevalence of undernutrition in Parkinson's disease and its relationship to clinical disease parameters. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1993;5(2):117-25.
- Martin, I., Kim, J.W., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2014. LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 131, 554–565.

Martínez de Morentin PB, Martínez-Sánchez N, Roa J, Ferno J, Nogueiras R, Tena-Sempere M, Dieguez C, Lopez M. Hypothalamic mTOR: the rookie energy sensor. *Curr Mol Med*. 2014 Jan;14(1):3-21.

Martinez Z, Zhu M, Han S, Fink AL. GM1 specifically interacts with α -synuclein and inhibits fibrillation. *Biochemistry*. 2007 Feb 20;46(7):1868-77.

Marwarha G, Ghribi O. Leptin signaling and Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis*. 2012;1(3):245-65.

Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L. Dopaminergic loss and inclusion body formation in α -synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*. 2000 Feb 18;287(5456):1265-9.

Matta MC, Soares DC, Kerstenetzky MS, Freitas AC, Kim CA, Torres LC. CD4+CD25 high Foxp3+ Treg deficiency in a Brazilian patient with Gaucher disease and lupus nephritis. *Hum Immunol*. 2016 Feb;77(2):196-200.

Matsuura K, Kabuto H, Makino H, Ogawa N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *J Neurosci Methods*. 1997 Apr 25;73(1):45-8.

Mauhin W, Lidove O, Masat E, Mingozi F, Mariampillai K, Ziza JM, Benveniste O. Innate and Adaptive Immune Response in Fabry Disease. *JIMD Rep*. 2015;22:1-10.

Mazzei JC, Zhou H, Brayfield BP, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J, Schmelz EM. Suppression of intestinal inflammation and inflammation-driven colon cancer in mice by dietary sphingomyelin: importance of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression. *J Nutr Biochem*. 2011 Dec;22(12):1160-71.

Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, Sidransky E, Grabowski GA, Krainc D. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*. 2011 Jul 8;146(1):37-52.

McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis*. 2002 Jul;10(2):119-27.

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988 Aug;38(8):1285-91.

McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG. Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol*. 1988;76(6):550-7.

McGeer PL, McGeer EG. Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1998;12 Suppl 2:S1-6.

McGlinchey RP, Lee JC. Emerging insights into the mechanistic link between α -synuclein and glucocerebrosidase in Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans.* 2013 Dec;41(6):1509-12.

McGuire SO, Ling ZD, Lipton JW, Sortwell CE, Collier TJ, Carvey PM. Tumor necrosis factor α is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Exp Neurol.* 2001 Jun;169(2):219-30.

McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R. The use of behavioral test batteries: Effects of training history *Physiol. Behav.* 2001; 73:705–717.

McLean JA, Tobin G. *Animal and Human Calorimetry.* New York: Cambridge University, 1987.

Meng X, Zheng R, Zhang Y, Qiao M, Liu L, Jing P, Wang L, Liu J, Gao Y. An activated sympathetic nervous system affects white adipocyte differentiation and lipolysis in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 2015 Feb;93(2):350-60.

Metcalf TU, Wilkinson PA, Cameron MJ, Ghneim K, Chiang C, Wertheimer AM, Hiscott JB, Nikolich-Zugich J, Haddad EK. Human Monocyte Subsets Are Transcriptionally and Functionally Altered in Aging in Response to Pattern Recognition Receptor Agonists. *J Immunol.* 2017 Aug 15;199(4):1405-1417.

Miake H, Mizusawa H, Iwatsubo T, Hasegawa M. Biochemical characterization of the core structure of α -synuclein filaments. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):19213-9.

Michel PP, Hefti F. Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res.* 1990 Aug;26(4):428-35.

Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron.* 2016 May 18;90(4):675-91.

Michelakakis H, Spanou C, Kondyli A, Dimitriou E, Van Weely S, Hollak CE, Van Oers MH, Aerts JM. Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Dec 16;1317(3):219-22.

Michell AW, Barker RA, Raha SK, Raha-Chowdhury R. A case of late onset sporadic Parkinson's disease with an A53T mutation in α -synuclein. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Apr;76(4):596-7. Erratum in: *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Jun;76(6):892.

Mielke MM, Maetzler W, Haughey NJ, Bandaru VV, Savica R, Deuschle C, Gasser T, Hauser AK, Gräber-Sultan S, Schleicher E, Berg D, Liepelt-Scarfone I. Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease and associated with cognitive impairment: a pilot study. *PLoS One.* 2013 Sep 18;8(9):e73094.

Migliore L, Petrozzi L, Lucetti C, Gambaccini G, Bernardini S, Scarpato R, Trippi F, Barale R, Frenzilli G, Rodilla V, Bonuccelli U. Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology.* 2002 Jun 25;58(12):1809-15.

Mistry PK, Belmatoug N, vom Dahl S, Giugliani R. Understanding the natural history of Gaucher disease. *Am J Hematol*. 2015 Jul;90 Suppl 1:S6-11.

Mitsui J, Matsukawa T, Sasaki H, Yabe I, Matsushima M, Dürr A, Brice A, Takashima H, Kikuchi A, Aoki M, Ishiura H, Yasuda T, Date H, Ahsan B, Iwata A, Goto J, Ichikawa Y, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Tanner CM, Kukull WA, Stern MB, Lee VM, Trojanowski JQ, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Ozelius LJ, Foroud T, Tsuji S. Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 Apr;2(4):417-26.

Mizukami H, Mi Y, Wada R, Kono M, Yamashita T, Liu Y, Werth N, Sandhoff R, Sandhoff K, Proia RL. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1215-21.

Mochizuki H, Yamada M, Mizuno Y. A-synuclein overexpression model. *J Neural Transm Suppl*. 2006;(70):281-4.

Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- α are elevated in the brain from Parkinsonian patients. *Neurosci Lett*. 1994 Oct 24;180(2):147-50.

Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Nagatsu T. Brain beta 2-microglobulin levels are elevated in the striatum in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1995;9(1):87-92.

Mori K, Mahmood MI, Neya S, Matsuzaki K, Hoshino T. Formation of GM1 ganglioside clusters on the lipid membrane containing sphingomyeline and cholesterol. *J Phys Chem B*. 2012 May 3;116(17):5111-21.

Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Dec;297(6):E1247-59.

Moro-García MA, Alonso-Arias R, López-Larrea C. When Aging Reaches CD4+ T-Cells: Phenotypic and Functional Changes. *Front Immunol*. 2013 May 10;4:107.

Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, Krantz DE, Kobayashi K, Edwards RH, Sulzer D. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and α -synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*. 2009 Apr 30;62(2):218-29.

Moskot M, Bocheńska K, Jakóbkiewicz-Banecka J, Banecki B, Gabig-Cimińska M. Abnormal Sphingolipid World in Inflammation Specific for Lysosomal Storage Diseases and Skin Disorders. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 15;19(1).

Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, Anisman H, Hayley S, Park DS. Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 2007 Mar 21;27(12):3328-37.

Mulcahy P, O'Doherty A, Paucard A, O'Brien T, Kirik D, Dowd E. The behavioural and neuropathological impact of intranigral AAV- α -synuclein is exacerbated by systemic infusion of the Parkinson's disease-associated pesticide, rotenone, in rats. *Behav Brain Res*. 2013 Apr 15;243:6-15.

Mullin BR, Decandis FX, Montanaro AJ, Reid JD. Myelin basic protein interacts with the myelin-specific ganglioside GM4. *Brain Res*. 1981 Oct 5;222(1):218-21.

Murphy KE, Halliday GM. Glucocerebrosidase deficits in sporadic Parkinson disease. *Autophagy*. 2014 Jul;10(7):1350-1.

Mutez E, Nkiliza A, Belarbi K, de Broucker A, Vanbesien-Mailliot C, Bleuse S, Duflot A, Comptdaer T, Semaille P, Blervaque R, Hot D, Leprêtre F, Figeac M, Destée A, Chartier-Harlin MC. Involvement of the immune system, endocytosis and EIF2 signaling in both genetically determined and sporadic forms of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2014 Mar;63:165-70.

Muthane U, Chickabasaviah Y, Kaneski C, Shankar SK, Narayanappa G, Christopher R, Govindappa SS. Clinical features of adult GM1 gangliosidosis: report of three Indian patients and review of 40 cases. *Mov Disord*. 2004 Nov;19(11):1334-41.

Muthuraman M, Koirala N, Ciolac D, Pinteá B, Glaser M, Groppa S, Tamás G, Groppa S. Deep Brain Stimulation and L-DOPA Therapy: Concepts of Action and Clinical Applications in Parkinson's Disease. *Front Neurol*. 2018 Aug 27;9:711.

Nagueh SF. Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders. *Circulation*. 2014 Sep 23;130(13):1081-90.

Nedergaard S, Flatman JA, Engberg I. Nifedipine- and omega-conotoxin-sensitive Ca²⁺ conductances in guinea-pig substantia nigra pars compacta neurones. *J Physiol*. 1993 Jul;466:727-47.

Negro A, Brunati AM, Donella-Deana A, Massimino ML, Pinna LA. Multiple phosphorylation of α -synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation. *FASEB J*. 2002 Feb;16(2):210-2.

Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, Reches A, Bembi B, Zimran A. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM*. 1996 Sep;89(9):691-4.

Neumann M, Müller V, Kretschmar HA, Haass C, Kahle PJ. Regional distribution of proteinase K-resistant α -synuclein correlates with Lewy body disease stage. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 Dec;63(12):1225-35.

Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, Li A, Holton J, Guerreiro R, Paudel R, Segarane B, Singleton A, Lees A, Hardy J, Houlden H, Revesz T, Wood NW. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain*. 2009 Jul;132(Pt 7):1783-94.

Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):512-22.

Nietupski JB, Pacheco JJ, Chuang WL, Maratea K, Li L, Foley J, Ashe KM, Cooper CG, Aerts JM, Copeland DP, Scheule RK, Cheng SH, Marshall J. Iminosugar-based inhibitors of glucosylceramide synthase prolong survival but paradoxically increase brain glucosylceramide levels in Niemann-Pick C mice. *Mol Genet Metab.* 2012 Apr;105(4):621-8.

Niwa F, Kuriyama N, Nakagawa M, Imanishi J. Effects of peripheral lymphocyte subpopulations and the clinical correlation with Parkinson's disease. *Geriatr Gerontol Int.* 2012 Jan;12(1):102-7.

Noelker C, Bacher M, Gocke P, Wei X, Klockgether T, Du Y, Dodel R. The flavanoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett.* 2005 Jul 22-29;383(1-2):39-43.

Noelker C, Lu L, Höllerhage M, Vulinovic F, Sturn A, Roscher R, Höglinger GU, Hirsch EC, Oertel WH, Alvarez-Fischer D, Andreas H. Glucocerebrosidase deficiency and mitochondrial impairment in experimental Parkinson disease. *J Neurol Sci.* 2015 Sep 15;356(1-2):129-36.

Noh SK, Koo SI. Egg sphingomyelin lowers the lymphatic absorption of cholesterol and α -tocopherol in rats. *J Nutr.* 2003 Nov;133(11):3571-6.

Noh SK, Koo SI. Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *J Nutr.* 2004 Oct;134(10):2611-6.

Nojiri H, Takaku F, Terui Y, Miura Y, Saito M. Ganglioside GM3: an acidic membrane component that increases during macrophage-like cell differentiation can induce monocytic differentiation of human myeloid and monocytoid leukemic cell lines HL-60 and U937. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Feb;83(3):782-6.

Nojiri H, Kitagawa S, Nakamura M, Kirito K, Enomoto Y, Saito M. Neolacto-series gangliosides induce granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *J Biol Chem.* 1988 Jun 5;263(16):7443-6.

Nordström V, Willershäuser M, Herzer S, Rozman J, von Bohlen Und Halbach O, Meldner S, Rothermel U, Kaden S, Roth FC, Waldeck C, Gretz N, de Angelis MH, Draguhn A, Klingenspor M, Gröne HJ, Jennemann R. Neuronal expression of glucosylceramide synthase in central nervous system regulates body weight and energy homeostasis. *PLoS Biol.* 2013;11(3):e1001506.

Norris EH, Giasson BI, Lee VM. A-synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol.* 2004;60:17-54.

Norris GH, Jiang C, Ryan J, Porter CM, Blesso CN. Milk sphingomyelin improves lipid metabolism and alters gut microbiota in high fat diet-fed mice. *J Nutr Biochem.* 2016 Apr;30:93-101.

Norris GH, Blesso CN. Dietary and Endogenous Sphingolipid Metabolism in Chronic Inflammation. *Nutrients.* 2017 Oct 28;9(11).

Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, Lees AJ, Schrag A. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2012 Dec;72(6):893-901.

Oddo S. The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012 Jan 1;4:941-52.

Oh WJ, Jacinto E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle*. 2011 Jul 15;10(14):2305-16. Epub 2011 Jul 15.

Ohmi Y, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Tajima O, Furukawa K, Furukawa K. Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues. *Neurochem Res*. 2012 Jun;37(6):1185-91.

Olanow CW, Kieburtz K, Odin P, Espay AJ, Standaert DG, Fernandez HH, Vanaganas A, Othman AA, Widnell KL, Robieson WZ, Pritchett Y, Chatamra K, Benesh J, Lenz RA, Antonini A; LCIG Horizon Study Group. Continuous intrajejunal infusion of levodopa-carbidopa intestinal gel for patients with advanced Parkinson's disease: a randomised, controlled, double-blind, double-dummy study. *Lancet Neurol*. 2014 Feb;13(2):141-9.

Olsen ASB, Færgeman NJ. Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biol*. 2017 May;7(5).

Orvisky E, Park JK, LaMarca ME, Ginns EI, Martin BM, Tayebi N, Sidransky E. Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype. *Mol Genet Metab*. 2002 Aug;76(4):262-70.

Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, Torizuka T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2005 Feb;57(2):168-75.

Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009 Dec;15 Suppl 3:S200-4.

Ozansoy, M., Basak, A.N., 2013. The central theme of Parkinson's disease: alpha-synuclein. *Mol. Neurobiol.* 47, 460–465.

Pak K, Shin HK, Kim EJ, Lee JH, Lyoo CH, Son J, Lee MJ. Weight loss is associated with rapid striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2018 Jun;51:67-72.

Paleologou KE, Oueslati A, Shakked G, Rospigliosi CC, Kim HY, Lamberto GR, Fernandez CO, Schmid A, Chegini F, Gai WP, Chiappe D, Moniatte M, Schneider BL, Aebischer P, Eliezer D, Zweckstetter M, Masliah E, Lashuel HA. Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits α -synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *J Neurosci*. 2010 Mar 3;30(9):3184-98.

Palmiter RD. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci*. 2007 Aug;30(8):375-81. Epub 2007 Jun 29.

Pandit R, Beerens S, Adan RAH. Role of leptin in energy expenditure: the hypothalamic perspective. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017 Jun 1;312(6):R938-R947.

Panicker LM, Miller D, Awad O, Bose V, Lun Y, Park TS, Zambidis ET, Sgambato JA, Feldman RA. Gaucher iPSC-derived macrophages produce elevated levels of inflammatory mediators and serve as a new platform for therapeutic development. *Stem Cells*. 2014 Sep;32(9):2338-49.

Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S, Jung R, Jackson S, Gille G, Spillantini MG, Reichmann H, Funk RH. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One*. 2010 Jan 19;5(1):e8762.

Pan-Montojo FJ, Funk RH. Oral administration of rotenone using a gavage and image analysis of α -synuclein inclusions in the enteric nervous system. *J Vis Exp*. 2010 Oct 26;(44).

Panneton WM, Kumar VB, Gan Q, Burke WJ, Galvin JE. The neurotoxicity of DOPAL:behavioral and stereological evidence for its role in Parkinson disease pathogenesis. *PLoS One*. 2010 Dec 13;5(12):e15251.

Papapetropoulos S, Ellul J, Paschalis C, Athanassiadou A, Papadimitriou A, Papapetropoulos T. Clinical characteristics of the α -synuclein mutation (G209A)-associated Parkinson's disease in comparison with other forms of familial Parkinson's disease in Greece. *Eur J Neurol*. 2003 May;10(3):281-6.

Parham KA, Zebol JR, Tooley KL, Sun WY, Moldenhauer LM, Cockshell MP, Gliddon BL, Moretti PA, Tigyi G, Pitson SM, Bonder CS. Sphingosine 1-phosphate is a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- γ that regulates neoangiogenesis. *FASEB J*. 2015 Sep;29(9):3638-53.

Park JY, Kim KS, Lee SB, Ryu JS, Chung KC, Choo YK, Jou I, Kim J, Park SM. On the mechanism of internalization of α -synuclein into microglia: roles of ganglioside GM1 and lipid raft. *J Neurochem*. 2009 Jul;110(1):400-11.

Parkkinen L, Neumann J, O'Sullivan SS, Holton JL, Revesz T, Hardy J, Lees AJ. Glucocerebrosidase mutations do not cause increased Lewy body pathology in Parkinson's disease. *Mol Genet Metab*. 2011 Aug;103(4):410-2.

Parkinson J. *An Essay on the Shaking Palsy*. London: Whittingham and Rowland for S herwood, Neely, and Jones; 1817.

Parkkinen L, Pirttilä T, Alafuzoff I. Applicability of current staging/categorization of α -synuclein pathology and their clinical relevance. *Acta Neuropathol*. 2008 Apr;115(4):399-407.

Parnetti L, Balducci C, Pierguidi L, De Carlo C, Peducci M, D'Amore C, Padiglioni C, Mastrocola S, Persichetti E, Paciotti S, Bellomo G, Tambasco N, Rossi A, Beccari T, Calabresi P. Cerebrospinal fluid beta-glucocerebrosidase activity is reduced in Dementia with Lewy Bodies. *Neurobiol Dis*. 2009 Jun;34(3):484-6.

- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Pöyhönen, M., Paetau, A., 2014. A novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol. Aging* 35 2180.e1–2180.e5.
- Pascale, E., Di Battista, M.E., Rubino, A., Purcaro, C., Valente, M., Fattapposta, F., Ferraguti, G., Meco, G., 2016. Genetic architecture of MAPT gene region in Parkinson disease subtypes. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 96.
- Pastores GM. Gaucher's Disease. Pathological features. *Baillieres Clin Haematol.* 1997 Dec;10(4):739-49.
- Paumier KL, Sukoff Rizzo SJ, Berger Z, Chen Y, Gonzales C, Kaftan E, Li L, Lotarski S, Monaghan M, Shen W, Stolyar P, Vasilyev D, Zaleska M, D Hirst W, Dunlop J. Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease. *PLoS One.* 2013 Aug 1;8(8):e70274.
- Pchelina SN, Nuzhnyi EP, Emelyanov AK, Boukina TM, Usenko TS, Nikolaev MA, Salogub GN, Yakimovskii AF, Zakharova EY. Increased plasma oligomeric α -synuclein in patients with lysosomal storage diseases. *Neurosci Lett.* 2014 Nov 7;583:188-93.
- Pennelli N, Scaravilli F, Zacchello F. The morphogenesis of Gaucher cells investigated by electron microscopy. *Blood.* 1969 Sep;34(3):331-47.
- Perese DA, Ulman J, Viola J, Ewing SE, Bankiewicz KS. A 6-hydroxydopamine-induced selective Parkinsonian rat model. *Brain Res.* 1989 Aug 14;494(2):285-93.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci.* 2002 Apr 15;22(8):3090-9. Erratum in: *J Neurosci* 2002 Oct 15;22(20):9142.
- Pessiglione M, Guehl D, Hirsch EC, Féger J, Tremblay L. Disruption of self-organized actions in monkeys with progressive MPTP-induced Parkinsonism. I. Effects of task complexity. *Eur J Neurosci.* 2004 Jan;19(2):426-36.
- Pettus BJ, Bielawska A, Subramanian P, Wijesinghe DS, Maceyka M, Leslie CC, Evans JH, Freiberg J, Roddy P, Hannun YA, Chalfant CE. Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem.* 2004 Mar 19;279(12):11320-6.
- Pilhatsch M, Kroemer NB, Schneider C, Ebersbach G, Jost WH, Fuchs G, Odin P, Reifschneider G, Bauer M, Reichmann H, Storch A. Reduced body mass index in Parkinson's disease: contribution of comorbid depression. *J Nerv Ment Dis.* 2013 Jan;201(1):76-9.
- Pino PA, Cardona AE. Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using percoll gradients. *J Vis Exp.* 2011 Feb 2;(48).
- Plotegher N, Duchon MR. Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration in Lysosomal Storage Disorders. *Trends Mol Med.* 2017 Feb;23(2):116-134.

Platt FM. Sphingolipid lysosomal storage disorders. *Nature*. 2014 Jun 5;510(7503):68-75.

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.E., Lang, A.E., 2017. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3, 17013. Politis M, Piccini P, Pavese N, Koh SB, Brooks DJ. Evidence of dopamine dysfunction in the hypothalamus of patients with Parkinson's disease: an in vivo 11C-raclopride PET study. *Exp Neurol* 2008;214(1):112-116.

Pollizzi KN, Patel CH, Sun IH, Oh MH, Waickman AT, Wen J, Delgoffe GM, Powell JD. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8⁺ T cell differentiation. *J Clin Invest*. 2015 May;125(5):2090-108.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047.

Pomés A, Rodríguez-Farré E, Suñol C. Disruption of GABA-dependent chloride flux by cyclodienes and hexachlorocyclohexanes in primary cultures of cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Dec;271(3):1616-23.

Posse de Chaves E, Sipione S. Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Lett*. 2010 May 3;584(9):1748-59.

Postuma RB, Aarsland D, Barone P, Burn DJ, Hawkes CH, Oertel W, Ziemssen T. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012 Apr 15;27(5):617-26.

Postuma RB, Gagnon JF, Vendette M, Fantini ML, Massicotte-Marquez J, Montplaisir J. Quantifying the risk of neurodegenerative disease in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology*. 2009 Apr 14;72(15):1296-300.

Prinetti A, Chigorno V, Prioni S, Loberto N, Marano N, Tettamanti G, Sonnino S. Changes in the lipid turnover, composition, and organization, as sphingolipid-enriched membrane domains, in rat cerebellar granule cells developing in vitro. *J Biol Chem*. 2001 Jun 15;276(24):21136-45.

Prinetti A, Loberto N, Chigorno V, Sonnino S. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jan;1788(1):184-93.

Proto C, Romualdi D, Cento RM, Spada RS, Di Mento G, Ferri R, Lanzone A. Plasma levels of neuropeptides in Alzheimer's disease. *Gynecol Endocrinol*. 2006 Apr;22(4):213-8.

Pruett ST, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, Liotta DC, Merrill AH Jr. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related aminoalcohols. *J Lipid Res.* 2008 Aug;49(8):1621-39.

Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience.* 1995 Aug;67(3):631-47.

Przedborski S, Ischiropoulos H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2005 May-Jun;7(5-6):685-93.

Qureshi GA, Baig S, Bednar I, Södersten P, Forsberg G, Siden A. Increased cerebrospinal fluid concentration of nitrite in Parkinson's disease. *Neuroreport.* 1995 Aug 21;6(12):1642-4.

Rama Rao KV, Kielian T. Astrocytes and lysosomal storage diseases. *Neuroscience.* 2016 May 26;323:195-206.

Ramalingam M, Kim SJ. Mechanisms of action of brain insulin against neurodegenerative diseases. *J Neural Transm (Vienna).* 2014 Jun;121(6):611-26.

Regier DS, Proia RL, D'Azzo A, Tiffet CJ. The GM1 and GM2 Gangliosidoses: Natural History and Progress toward Therapy. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2016 Jun;13 Suppl 1:663-73.

Rezai-Zadeh K, Münzberg H. Integration of sensory information via central thermoregulatory leptin targets. *Physiol Behav.* 2013 Sep 10;121:49-55.

Riboni L, Prinetti A, Pitto M, Tettamanti G. Patterns of endogenous gangliosides and metabolic processing of exogenous gangliosides in cerebellar granule cells during differentiation in culture. *Neurochem Res.* 1990 Dec;15(12):1175-83.

Riboni L, Prinetti A, Bassi R, Tettamanti G. Formation of bioactive sphingoid molecules from exogenous sphingomyelin in primary cultures of neurons and astrocytes. *FEBS Lett.* 1994 Oct 3;352(3):323-6.

F, Fleming SM, Watson M, Lemesre V, Pellegrino L, Raney B, Zhu C, Mortazavi F, Mulligan CK, Sioshansi PC, Hean S, De La Rosa K, Khanna R, Flanagan J, Lockhart DJ, Wustman BA, Clark SW, Chesselet MF. A GCase chaperone improves motor function in a mouse model of synucleinopathy. *Neurotherapeutics.* 2014 Oct;11(4):840-56.

Ridley CM, Thur KE, Shanahan J, Thillaiappan NB, Shen A, Uhl K, Walden CM, Rahim AA, Waddington SN, Platt FM, van der Spoel AC. β -Glucosidase 2 (GBA2) activity and imino sugar pharmacology. *J Biol Chem.* 2013 Sep 6;288(36):26052-66.

Rigante D, Cipolla C, Basile U, Gulli F, Savastano MC. Overview of immune abnormalities in lysosomal storage disorders. *Immunol Lett.* 2017 Aug;188:79-85.

Rittenhouse AR, Zigmond RE. Role of N- and L-type calcium channels in depolarization-induced activation of tyrosine hydroxylase and release of norepinephrine by sympathetic cell bodies and nerve terminals. *J Neurobiol.* 1999 Aug;40(2):137-48.

Rivero-Ríos P, Gómez-Suaga P, Fdez E, Hilfiker S. Upstream deregulation of calcium signaling in Parkinson's disease. *Front Mol Neurosci.* 2014 Jun 17;7:53.

Roa J, Tena-Sempere M. Connecting metabolism and reproduction: roles of central energy sensors and key molecular mediators. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 Nov;397(1-2):4-14.

Robak LA, Jansen IE, van Rooij J, Uitterlinden AG, Kraaij R, Jankovic J; International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC), Heutink P, Shulman JM. Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson's disease. *Brain.* 2017 Dec 1;140(12):3191-3203.

Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Graham AR, Brown E, McLean JR, Hayes MA, Beagan J, Izen SC, Perez-Torres E, Hallett PJ, Isacson O. Sustained Systemic Glucocerebrosidase Inhibition Induces Brain α -Synuclein Aggregation, Microglia and Complement C1q Activation in Mice. *Antioxid Redox Signal.* 2015 Aug 20;23(6):550-64.

Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, Masliah E. Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing α -synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res.* 2002 Jun 1;68(5):568-78.

Rockenstein E, Clarke J, Viel C, Panarello N, Treleaven CM, Kim C, Spencer B, Adame A, Park H, Dodge JC, Cheng SH, Shihabuddin LS, Masliah E, Sardi SP. Glucocerebrosidase modulates cognitive and motor activities in murine models of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2016 Jul 1;25(13):2645-2660.

Rosenbaum H, Aharon-Peretz J, Brenner B. Hypercoagulability, parkinsonism, and Gaucher disease. *Semin Thromb Hemost.* 2013 Nov;39(8):928-34.

Rosenbloom B, Balwani M, Bronstein JM, Kolodny E, Sathe S, Gwosdow AR, Taylor JS, Cole JA, Zimran A, Weinreb NJ. The incidence of Parkinsonism in patients with type 1 Gaucher disease: data from the ICGG Gaucher Registry. *Blood Cells Mol Dis.* 2011 Jan 15;46(1):95-102.

Ross OA, Soto-Ortolaza AI, Heckman MG, Aasly JO, Abahuni N, Annesi G, Bacon JA, Bardien S, Bozi M, Brice A, Brighina L, Van Broeckhoven C, Carr J, Chartier-Harlin MC, Dardiotis E, Dickson DW, Diehl NN, Elbaz A, Ferrarese C, Ferraris A, Fiske B, Gibson JM, Gibson R, Hadjigeorgiou GM, Hattori N, Ioannidis JP, Jasinska-Myga B, Jeon BS, Kim YJ, Klein C, Kruger R, Kyrtzi E, Lesage S, Lin CH, Lynch T, Maraganore DM, Mellick GD, Mutez E, Nilsson C, Opala G, Park SS, Puschmann A, Quattrone A, Sharma M, Silburn PA, Sohn YH, Stefanis L, Tadic V, Theuns J, Tomiyama H, Uitti RJ, Valente EM, van de Loo S, Vassilatis DK, Vilariño-Güell C, White LR, Wirdefeldt K, Wszolek ZK, Wu RM, Farrer MJ; Genetic Epidemiology Of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2011 Oct;10(10):898-908.

Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, Launer L, White LR. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2008 Feb;63(2):167-73.

Roth J, Ponzoni S, Aschner M. Manganese homeostasis and transport. *Met Ions Life Sci*. 2013;12:169-201.

Rothman SM, Griffioen KJ, Fishbein KW, Spencer RG, Makrogiannis S, Cong WN, Martin B, Mattson MP. Metabolic abnormalities and hypoleptinemia in α -synuclein A53T mutant mice. *Neurobiol Aging*. 2014 May;35(5):1153-61. Roy, A., Jana, A., Yatish, K., Freidt, M. B., Fung, Y. K., Martinson, J. A., and Pahan, K. (2008) Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 686 – 699

Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013 Dec;14(4):387-407.

Ruiz-Martinez, J., Krebs, C.E., Makarov, V., Gorostidi, A., Marti-Masso, J.F., Paisan-Ruiz, C., 2015. GIGYF2 mutation in late-onset Parkinson's disease with cognitive impairment. *J. Hum. Genet.* 60, 637–640.

Russo D, Della Ragione F, Rizzo R, Sugiyama E, Scalabrì F, Hori K, Capasso S, Sticco L, Fioriniello S, De Gregorio R, Granata I, Guarracino MR, Maglione V, Johannes L, Bellenchi GC, Hoshino M, Setou M, D'Esposito M, Luini A, D'Angelo G. Glycosphingolipid metabolic reprogramming drives neural differentiation. *EMBO J*. 2018 Apr 3;37(7).

Rybicki BA, Johnson CC, Uman J, Gorell JM. Parkinson's disease mortality and the industrial use of heavy metals in Michigan. *Mov Disord*. 1993;8(1):87-92.

Saffari A, Kölker S, Hoffmann GF, Ebrahimi-Fakhari D. Linking mitochondrial dysfunction to neurodegeneration in lysosomal storage diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2017 Sep;40(5):631-640.

Saint-Pierre M, Tremblay ME, Sik A, Gross RE, Cicchetti F. Temporal effects of paraquat/maneb on microglial activation and dopamine neuronal loss in older rats. *J Neurochem*. 2006 Aug;98(3):760-72.

Salamone JD, Correa M. Insulin and ventral tegmental dopamine: what's impaired and what's intact? *Cell Metab*. 2013 Apr 2;17(4):469-70.

Saito Y, Suzuki K, Hulette CM, Murayama S. Aberrant phosphorylation of α -synuclein in human Niemann-Pick type C1 disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 Apr;63(4):323-8.

Sam AH, Troke RC, Tan TM, Bewick GA. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology*. 2012 Jul;63(1):46-56.

Samii A, Etminan M, Wiens MO, Jafari S. NSAID use and the risk of Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Drugs Aging*. 2009;26(9):769-79.

Sandhoff K. Bioactive glycosphingolipids with differentiation-inducing activity toward leukemia cells. *Jpn J Cancer Res.* 1993 Nov;84(11).

Sandhoff K. Neuronal sphingolipidoses: Membrane lipids and sphingolipid activator proteins regulate lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochimie.* 2016 Nov;130:146-151.

Sandhoff R, Sandhoff K. Emerging concepts of ganglioside metabolism. *FEBS Lett.* 2018 May 26.

Sardi SP, Clarke J, Kinnecom C, Tamsett TJ, Li L, Stanek LM, Passini MA, Grabowski GA, Schlossmacher MG, Sidman RL, Cheng SH, Shihabuddin LS. CNS expression of glucocerebrosidase corrects α -synuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jul 19;108(29):12101-6.

Sardi SP, Clarke J, Viel C, Chan M, Tamsett TJ, Treleaven CM, Bu J, Sweet L, Passini MA, Dodge JC, Yu WH, Sidman RL, Cheng SH, Shihabuddin LS. Augmenting CNS glucocerebrosidase activity as a therapeutic strategy for Parkinsonism and other Gaucher-related synucleinopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 26;110(9):3537-42.

Scheel G, Acevedo E, Conzelmann E, Nehr Korn H, Sandhoff K. Model for the interaction of membrane-bound substrates and enzymes. Hydrolysis of ganglioside GD1a by sialidase of neuronal membranes isolated from calf brain. *Eur J Biochem.* 1982 Oct;127(2):245-53.

Schenck CH(1), Bundlie SR, Ettinger MG, Mahowald MW. Chronic behavioral disorders of human REM sleep: a new category of parasomnia. *Sleep.* 1986 Jun;9(2):293-308.

Schenck CH, Bundlie SR, Mahowald MW. Delayed emergence of a Parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology.* 1996 Feb;46(2):388-93. Erratum in: *Neurology* 1996 Jun;46(6):1787.

Schengrund CL. Gangliosides: glycosphingolipids essential for normal neural development and function. *Trends Biochem Sci.* 2015 Jul;40(7):397-406.

Schiffmann R, Ries M. Fabry Disease: A Disorder of Childhood Onset. *Pediatr Neurol.* 2016 Nov;64:10-20.

Schnaar RL, Suzuki A, Stanley P. Glycosphingolipids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology.* 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 10.

Schnaar RL. Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *J Mol Biol.* 2016 Aug 14;428(16):3325-3336.

Schneider JS. Modeling Cognitive Deficits Associated with Parkinsonism in the Chronic-Low-Dose MPTP-Treated Monkey. In: Levin ED, Buccafusco JJ, editors. *Animal Models of Cognitive Impairment.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2006. Chapter 9.

Schneider JS, Sendek S, Daskalakis C, Cambi F. GM1 ganglioside in Parkinson's disease: Results of a five year open study. *J Neurol Sci.* 2010 May 15;292(1-2):45-51.

Schneider JS. Gangliosides and glycolipids in neurodegenerative disorders. *Adv Neurobiol.* 2014;9:449-61.

Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004 Oct;318(1):215-24.

Schuchman EH, Desnick RJ. Types A and B Niemann-Pick disease. *Mol Genet Metab.* 2017 Jan - Feb;120(1-2):27-33.

Schultheis PJ, Fleming SM, Clippinger AK, Lewis J, Tsunemi T, Giasson B, Dickson DW, Mazzulli JR, Bardgett ME, Haik KL, Ekhaton O, Chava AK, Howard J, Gannon M, Hoffman E, Chen Y, Prasad V, Linn SC, Tamargo RJ, Westbroek W, Sidransky E, Krainc D, Shull GE. Atp13a2-deficient mice exhibit neuronal ceroid lipofuscinosis, limited α -synuclein accumulation and age-dependent sensorimotor deficits. *Hum Mol Genet.* 2013 May 15;22(10):2067-82.

Schultz ML, Tecedor L, Chang M, Davidson BL. Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends Neurosci.* 2011 Aug;34(8):401-10.

Scott DA, Tabarean I, Tang Y, Cartier A, Masliah E, Roy S. A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in α -synuclein-induced neurodegeneration. *J Neurosci.* 2010 Jun 16;30(24):8083-95.

Seirafi M, Kozlov G, Gehring K. Parkin structure and function. *FEBS J.* 2015 Jun;282(11):2076-88.

Seregini SS, Amalfitano A. Gene therapy for lysosomal storage diseases: progress, challenges and future prospects. *Curr Pharm Des.* 2011;17(24):2558-74.

Settembre C, Fraldi A, Rubinsztein DC, Ballabio A. Lysosomal storage diseases as disorders of autophagy. *Autophagy.* 2008 Jan;4(1):113-4.

Seward ME, Swanson E, Norambuena A, Reimann A, Cochran JN, Li R, Roberson ED, Bloom GS. Amyloid- β signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer's disease. *J Cell Sci.* 2013 Mar 1;126(Pt 5):1278-86.

Shachar T, Lo Bianco C, Recchia A, Wiessner C, Raas-Rothschild A, Futerman AH. Lysosomal storage disorders and Parkinson's disease: Gaucher disease and beyond. *Mov Disord.* 2011 Aug 1;26(9):1593-604.

Sharma JC, Vassallo M. Prognostic significance of weight changes in Parkinson's disease: the Park-weight phenotype. *Neurodegener Dis Manag.* 2014;4(4):309-16.

Sharma JC, Lewis A. Weight in Parkinson's Disease: Phenotypical Significance. *Int Rev Neurobiol.* 2017;134:891-919.

Sheard JM, Ash S, Silburn PA, Kerr GK. Prevalence of malnutrition in Parkinson's disease: a systematic review. *Nutr Rev*. 2011 Sep;69(9):520-32.

Shepard PD, Stump D. Nifedipine blocks apamin-induced bursting activity in nigral dopamine-containing neurons. *Brain Res*. 1999 Jan 30;817(1-2):104-9.

Shi L, Du X, Jiang H, Xie J. Ghrelin and Neurodegenerative Disorders-a Review. *Mol Neurobiol*. 2017 Mar;54(2):1144-1155.

Shimozawa A, Ono M, Takahara D, Tarutani A, Imura S, Masuda-Suzukake M, Higuchi M, Yanai K, Hisanaga SI, Hasegawa M. Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain. *Acta Neuropathol Commun*. 2017 Feb 2;5(1):12.

Shin EC, Cho SE, Lee DK, Hur MW, Paik SR, Park JH, Kim J. Expression patterns of α -synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages. *Mol Cells*. 2000 Feb 29;10(1):65-70.

Shioda, S., Funahashi, H., Nakajo, S., Yada, T., Maruta, O., & Nakai, Y. (1998). Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 243(1-3), 41–44.

Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev*. 2012 May;247(1):52-63.

Sherer TB, Betarbet R, Kim JH, Greenamyre JT. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2003 May 1;341(2):87-90.

Shoenfeld Y, Gallant LA, Shaklai M, Livni E, Djaldetti M, Pinkhas J. Gaucher's disease: a disease with chronic stimulation of the immune system. *Arch Pathol Lab Med*. 1982 Aug;106(8):388-91.

Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, Chen CM, Clark LN, Condroyer C, De Marco EV, Dürr A, Eblan MJ, Fahn S, Farrer MJ, Fung HC, Gan-Or Z, Gasser T, Gershoni-Baruch R, Giladi N, Griffith A, Gurevich T, Januario C, Kropp P, Lang AE, Lee-Chen GJ, Lesage S, Marder K, Mata IF, Mirelman A, Mitsui J, Mizuta I, Nicoletti G, Oliveira C, Ottman R, Orr-Urtreger A, Pereira LV, Quattrone A, Rogaeva E, Rolfs A, Rosenbaum H, Rozenberg R, Samii A, Samaddar T, Schulte C, Sharma M, Singleton A, Spitz M, Tan EK, Tayebi N, Toda T, Troiano AR, Tsuji S, Wittstock M, Wolfsberg TG, Wu YR, Zabetian CP, Zhao Y, Ziegler SG. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2009 Oct 22;361(17):1651-61.

Sidransky E. Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. *Discov Med*. 2012 Oct;14(77):273-81.

Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and Parkinsonism. *Lancet Neurol*. 2012 Nov;11(11):986-98.

Simanshu DK, Kamlekar RK, Wijesinghe DS, Zou X, Zhai X, Mishra SK, Molotkovsky JG, Malinina L, Hinchcliffe EH, Chalfant CE, Brown RE, Patel DJ. Non-vesicular trafficking by a

ceramide-1-phosphate transfer protein regulates eicosanoids. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):463-7.

Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Krüger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1308-12.

Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentert M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. (2003). α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302(5646): 841.

Smyth LT, Ruhf RC, Whitman NE, Dugan T. Clinical manganism and exposure to manganese in the production and processing of ferromanganese alloy. *J Occup Med*. 1973 Feb;15(2):101-9.

Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*. 2007 Jan;17(1):1R-13R. Epub 2006 Sep 18. Review. Erratum in: *Glycobiology*. 2007 Oct;17(10):1030.

Sonnino S, Prinetti A. Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Curr Med Chem*. 2013;20(1):4-21.

Sotiropoulos C, Theodorou G, Repa C, Marinakis T, Verigou E, Solomou E, Karakantza M, Symeonidis A. Severe impairment of regulatory T-cells and Th1-lymphocyte polarization in patients with Gaucher disease. *JIMD Rep*. 2015;18:107-15.

Spielman LJ, Little JP, Klegeris A. Inflammation and insulin/IGF-1 resistance as the possible link between obesity and neurodegeneration. *J Neuroimmunol*. 2014 Aug 15;273(1-2):8-21.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388(6645): 839-40.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*. 1998 Jul 31;251(3):205-8.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):6469-73.

Spillantini MG, Goedert M. Neurodegeneration and the ordered assembly of α -synuclein. *Cell Tissue Res*. 2018 Jul;373[1]:137-148.

Sprong RC, Hulstein MF, Van der Meer R. Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):1298-301.

Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis.* 2005 Feb;7(1):63-80.

Stephens MC, Bernatsky A, Singh H, Kanfer JN, Legler G. Distribution of conduritol B epoxide in the animal model for Gaucher's disease (Gaucher mouse). *Biochim Biophys Acta.* 1981 Jan 7;672(1):29-32.

Stevens CH, Rowe D, Morel-Kopp MC, Orr C, Russell T, Ranola M, Ward C, Halliday GM. Reduced T helper and B lymphocytes in Parkinson's disease. *J Neuroimmunol.* 2012 Nov 15;252(1-2):95-9.

Stievenard A, Méquinion M, Andrews ZB, Destée A, Chartier-Harlin MC, Viltart O, Vanbesien-Mailliot CC. Is there a role for ghrelin in central dopaminergic systems? Focus on nigrostriatal and mesocorticolimbic pathways. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017 Feb;73:255-275.

Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, Levade T, Astudillo L, Serratrice J, Brassier A, Rose C, Billette de Villemeur T, Berger MG. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 17;18(2).

Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 20;101(16):6062-7.

Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2008 Nov;29(11):1690-701.

Su X, Federoff HJ, Maguire-Zeiss KA. Mutant α -synuclein overexpression mediates early proinflammatory activity. *Neurotox Res.* 2009 Oct;16(3):238-54.

Sudhaman, S., Muthane, U.B., Behari, M., Govindappa, S.T., Juyal, R.C., Thelma, B.K., 2016. Evidence of mutations in RIC3 acetylcholine receptor chaperone as a novel cause of autosomal-dominant Parkinson's disease with non-motor phenotypes. *J. Med. Genet.* 53, 559–566.

Sukoff Rizzo SJ, Silverman JL. Methodological Considerations for Optimizing and Validating Behavioral Assays. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2016 Dec 1;6(4):364-379.

Sultana S, Reichbauer J, Schüle R, Mochel F, Synofzik M, van der Spoel AC. Lack of enzyme activity in GBA2 mutants associated with hereditary spastic paraplegia/cerebellar ataxia (SPG46). *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Sep 11;465(1):35-40.

Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2007 May;30(5):244-50.

Sulzer D, Alcalay RN, Garretti F, Cote L, Kanter E, Agin-Liebes J, Liong C, McMurtrey C, Hildebrand WH, Mao X, Dawson VL, Dawson TM, Oseroff C, Pham J, Sidney J, Dillon MB, Carpenter C, Weiskopf D, Phillips E, Mallal S, Peters B, Frazier A, Lindestam Arlehamn CS, Sette A. T cells from patients with Parkinson's disease recognize α -synuclein peptides. *Nature*. 2017 Jun 29;546(7660):656-661. doi: 10.1038/nature22815. Epub 2017 Jun 21. Erratum in: *Nature*. 2017 Sep 13;549(7671):292.

Surmeier DJ, Schumacker PT. Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Biol Chem*. 2013 Apr 12;288(15):10736-41.

Svennerholm L. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J Neurochem*. 1963 Sep;10:613-23.

Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, Palmiter RD. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron*. 2001 Jun;30(3):819-28.

Tait SW, Green DR. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Sep 1;5(9).

Takahashi RN, Rogerio R, Zanin M. Maneb enhances MPTP neurotoxicity in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1989 Oct;66(1):167-70.

Takahashi M, Yamada T, Tooyama I, Moroo I, Kimura H, Yamamoto T, Okada H. Insulin receptor mRNA in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1996 Feb 9;204(3):201-4.

Takei N, Nawa H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Front Mol Neurosci*. 2014 Apr 23;7:28.

Talbot K., Wang H. Y., Kazi H., Han L. Y., Bakshi K. P., Stucky A., Fuino R. L., Kawaguchi K. R., Samoyedny A. J., Wilson R. S., Arvanitakis Z., Schneider J. A., Wolf B. A., Bennett D. A., Trojanowski J. Q., Arnold S. E. (2012) Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 122, 1316–1338.

Tamargo RJ, Velayati A, Goldin E, Sidransky E. The role of saposin C in Gaucher disease. *Mol Genet Metab*. 2012 Jul;106(3):257-63.

Tanji K, Mori F, Imaizumi T, Yoshida H, Matsumiya T, Tamo W, Yoshimoto M, Odagiri H, Sasaki M, Takahashi H, Satoh K, Wakabayashi K. Upregulation of α -synuclein by lipopolysaccharide and interleukin-1 in human macrophages. *Pathol Int*. 2002 Sep;52(9):572-7.

Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., Comyns, K., Richards, M.B., Meng, C., Priestley, B., Fernandez, H.H., Cambi, F., Umbach, D.M., Blair, A., Sandler, D.P., and Langston, J.W. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 119, 866-872.

Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis.* 2010 Mar;37(3):510-8.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *C ell.* 1995; 83:1263–71.

Taylor TN, Caudle WM, Shepherd KR, Noorian A, Jackson CR, Iuvone PM, Weinshenker D, Greene JG, Miller GW. Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity. *J Neurosci.* 2009 Jun 24;29(25):8103-13.

Taylor TN, Caudle WM, Miller GW. VMAT2-Deficient Mice Display Nigral and Extranigral Pathology and Motor and Nonmotor Symptoms of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2011 Feb 21;2011:124165.

Thannickal TC, Lai YY, Siegel JM. Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease. *Brain.* 2007 Jun;130(Pt 6):1586-95.

Thayanidhi N, Helm JR, Nycz DC, Bentley M, Liang Y, Hay JC. A-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol Biol Cell.* 2010 Jun 1;21(11):1850-63.

Theodore S, Cao S, McLean PJ, Standaert DG. Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008 Dec;67(12):1149-58.

Theodore S, Maragos W. 6-Hydroxydopamine as a tool to understand adaptive immune system-induced dopamine neurodegeneration in Parkinson's disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2015;37(4):393-9.

Theodoropoulou A, Metallinos IC, Psyrogiannis A, Vagenakis GA, Kyriazopoulou V. Ghrelin and leptin secretion in patients with moderate Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging.* 2012 May;16(5):472-7.

Thiel A, Scheffold A, Radbruch A. Antigen-specific cytometry--new tools arrived! *Clin Immunol.* 2004 May;111(2):155-61.

Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res.* 2000 Aug 11;873(2):225-34.

Thiruchelvam M, McCormack A, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Di Monte DA, Cory-Slechta DA. Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *Eur J Neurosci.* 2003 Aug;18(3):589-600.

Thiruchelvam MJ, Powers JM, Cory-Slechta DA, Richfield EK. Risk factors for dopaminergic neuron loss in human α -synuclein transgenic mice. *Eur J Neurosci.* 2004 Feb;19(4):845-54.

Tillerson JL, Caudle WM, Reveron ME, Miller GW. Detection of behavioral impairments correlated to neurochemical deficits in mice treated with moderate doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine. *Exp Neurol* 2002;178:80–90.

Tinakoua A, Bouabid S, Faggiani E, De Deurwaerdère P, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A. The impact of combined administration of paraquat and maneb on motor and non-motor functions in the rat. *Neuroscience*. 2015 Dec 17;311:118-29.

Titova N, Chaudhuri KR. Apomorphine therapy in Parkinson's and future directions. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016 Dec;33 Suppl 1:S56-S60.

Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, Hakomori SI. Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 12;105(6):1925-30.

Tofaris GK, Garcia Reitböck P, Humby T, Lambourne SL, O'Connell M, Ghetti B, Gossage H, Emson PC, Wilkinson LS, Goedert M, Spillantini MG. Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human α -synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders. *J Neurosci*. 2006 Apr 12;26(15):3942-50.

Torres S, Matías N, Baulies A, Nuñez S, Alarcon-Vila C, Martinez L, Nuño N, Fernandez A, Caballeria J, Levade T, Gonzalez-Franquesa A, Garcia-Rovés P, Balboa E, Zanlungo S, Fabrias G, Casas J, Enrich C, Garcia-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial GSH replenishment as a potential therapeutic approach for Niemann Pick type C disease. *Redox Biol*. 2017 Apr;11:60-72.

Torsney, K. M., Noyce, a. J., Doherty, K. M., Bestwick, J. P., Dobson, R., & Lees, a. J. (2014). Bone health in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 85(10), 1159–1166.

Toth MJ, Poehlman ET. Energetic adaptation to chronic disease in the elderly. *Nutr Rev*. 2000 Mar;58(3 Pt 1):61-6.

Touchman JW, Dehejia A, Chiba-Falek O, Cabin DE, Schwartz JR, Orrison BM, Polymeropoulos MH, Nussbaum RL. Human and mouse α -synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element. *Genome Res*. 2001 Jan;11(1):78-86.

Tramutola A, Lanzillotta C, Perluigi M, Butterfield DA. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res Bull*. 2017 Jul;133:88-96.

Trapero A, González-Bulnes P, Butters TD, Llebaria A. Potent aminocyclitol glucocerebrosidase inhibitors are subnanomolar pharmacological chaperones for treating gaucher disease. *J Med Chem*. 2012 May 10;55(9):4479-88.

Treiber A, Morand O, Clozel M. The pharmacokinetics and tissue distribution of the glucosylceramide synthase inhibitor miglustat in the rat. *Xenobiotica*. 2007 Mar;37(3):298-314.

Tsuang D, Leverenz JB, Lopez OL, Hamilton RL, Bennett DA, Schneider JA, Buchman AS, Larson EB, Crane PK, Kaye JA, Kramer P, Woltjer R, Kukull W, Nelson PT, Jicha GA, Neltner JH, Galasko D, Masliah E, Trojanowski JQ, Schellenberg GD, Yearout D, Huston H, Fritts-Penniman A, Mata IF, Wan JY, Edwards KL, Montine TJ, Zabetian CP. GBA mutations increase risk for Lewy body disease with and without Alzheimer disease pathology. *Neurology*. 2012 Nov 6;79(19):1944-50.

Tu PH, Galvin JE, Baba M, Giasson B, Tomita T, Leight S, Nakajo S, Iwatsubo T, Trojanowski JQ, Lee VM. Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble α -synuclein. *Ann Neurol*. 1998 Sep;44(3):415-22.

Uc EY, Struck LK, Rodnitzky RL, Zimmerman B, Dobson J, Evans WJ. Predictors of weight loss in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006 Jul;21(7):930-6.

Unger MM, Möller JC, Mankel K, Eggert KM, Bohne K, Bodden M, Stiasny-Kolster K, Kann PH, Mayer G, Tebbe JJ, Oertel WH. Postprandial ghrelin response is reduced in patients with Parkinson's disease and idiopathic REM sleep behavior disorder: a peripheral biomarker for early Parkinson's disease? *J Neurol*. 2011 Jun;258(6):982-90.

Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1968 Dec;5(1):107-10.

Ungerstedt U. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1971;367:95-122.

Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. *J Neurochem*. 2007 Oct;103(1):17-37.

Vaccaro AM, Motta M, Tatti M, Scarpa S, Masuelli L, Bhat M, Vanier MT, Tytki-Szymanska A, Salvioli R. Saposin C mutations in Gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation, saposin C deficiency, but normal prosaposin processing and sorting. *Hum Mol Genet*. 2010 Aug 1;19(15):2987-97.

Vale C, Fonfría E, Bujons J, Messegueur A, Rodríguez-Farré E, Suñol C. The organochlorine pesticides gamma-hexachlorocyclohexane (lindane), alpha-endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA(A) and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience*. 2003;117(2):397-403.

Van der Marck MA, Dicke HC, Uc EY, Kentin ZH, Borm GF, Bloem BR, Overeem S, Munneke M. Body mass index in Parkinson's disease: a meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012 Mar;18(3):263-7.

Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011 Feb;17(2):179-88. doi: 10.1038/nm.2279. Epub 2011 Jan 9.

Vanier MT. [Niemann-Pick C disease: history, current research topics, biological and molecular diagnosis]. *Arch Pediatr*. 2010 Jun;17 Suppl 2:S41-4.

Van Wamelen DJ, Grigoriou S, Chaudhuri KR, Odin P. Continuous Drug Delivery Aiming Continuous Dopaminergic Stimulation in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2018;8(s1):S65-S72.

Van Weely S, van den Berg M, Barranger JA, Sa Miranda MC, Tager JM, Aerts JM. Role of pH in determining the cell-type-specific residual activity of glucocerebrosidase in type 1 Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1993 Mar;91(3):1167-75.

Vardi A, Zigdon H, Meshcheriakova A, Klein AD, Yaacobi C, Eilam R, Kenwood BM, Rahim AA, Massaro G, Merrill AH Jr, Vitner EB, Futerman AH. Delineating pathological pathways in a chemically induced mouse model of Gaucher disease. *J Pathol.* 2016 Aug;239(4):496-509.

Velayati A, Yu WH, Sidransky E. The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010 May;10(3):190-8.

Verity C, Winstone AM, Stellitano L, Will R, Nicoll A. The epidemiology of progressive intellectual and neurological deterioration in childhood. *Arch Dis Child.* 2010 May;95(5):361-4.

Vezoli J, Fifel K, Leviel V, Dehay C, Kennedy H, Cooper HM, Gronfier C, Procyk E. Early presymptomatic and long-term changes of rest activity cycles and cognitive behavior in a MPTP-monkey model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 2011;6(8):e23952.

Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Gavaldà-Navarro A, Giralt M. Toward an Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology. *Cell Metab.* 2018 May 1;27(5):954-961.

Vitner EB, Platt FM, Futerman AH. Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem.* 2010 Jul 2;285(27):20423-7.

Vizcarra JA, Lang AE, Sethi KD, Espay AJ. Vascular Parkinsonism: Deconstructing a syndrome. *Mov Disorders* 2015;30:886-94.

Voccoli V, Tonazzini I, Signore G, Caleo M, Cecchini M. Role of extracellular calcium and mitochondrial oxygen species in psychosine-induced oligodendrocyte cell death. *Cell Death Dis.* 2014 Nov 20;5:e1529.

Volders P, Van Hove J, Lories RJ, Vandekerckhove P, Matthijs G, De Vos R, Vanier MT, Vincent MF, Westhovens R, Luyten FP. Niemann-Pick disease type B: an unusual clinical presentation with multiple vertebral fractures. *Am J Med Genet.* 2002 Apr 15;109(1):42-51.

Volpicelli-Daley LA, Kirik D, Stoyka LE, Standaert DG, Harms AS. How can rAAV- α -synuclein and the fibril α -synuclein models advance our understanding of Parkinson's disease? *J Neurochem.* 2016 Oct;139 Suppl 1:131-155.

Voon V, Potenza MN, Thomsen T. Medication-related impulse control and repetitive behaviors in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 2007 Aug;20(4):484-92.

Vykuntaraju KN, Lokanatha H, Shivananda. Niemann-Pick disease type A presenting as unilateral tremors. *Indian Pediatr.* 2012 Nov;49(11):919-20.

Wakabayashi K, Hayashi S, Kakita A, Yamada M, Toyoshima Y, Yoshimoto M, Takahashi H. Accumulation of α -synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy. *Acta Neuropathol.* 1998 Nov;96(5):445-52.

Wakamatsu M, Ishii A, Iwata S, Sakagami J, Ukai Y, Ono M, Kanbe D, Muramatsu S, Kobayashi K, Iwatsubo T, Yoshimoto M. Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human α -synuclein in mice. *Neurobiol Aging.* 2008 Apr;29(4):574-85.

Walden CM, Sandhoff R, Chuang CC, Yildiz Y, Butters TD, Dwek RA, Platt FM, van der Spoel AC. Accumulation of glucosylceramide in murine testis, caused by inhibition of beta-glucosidase 2: implications for spermatogenesis. *J Biol Chem.* 2007 Nov 9;282(45):32655-64.

Walker DG, Lue LF, Adler CH, Shill HA, Caviness JN, Sabbagh MN, Akiyama H, Serrano GE, Sue LI, Beach TG; Arizona Parkinson Disease Consortium. Changes in properties of serine 129 phosphorylated α -synuclein with progression of Lewy-type histopathology in human brains. *Exp Neurol.* 2013 Feb;240:190-204.

Wang, G., Huang, Y., Chen, W., Chen, S., Wang, Y., Xiao, Q., Liu, J., Fung, V.S., Halliday, G., Chen, S., 2016a. Variants in the SNCA gene associate with motor progression while variants in the MAPT gene associate with the severity of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 24, 89–94.

Wang, L., Fleming, S. M., Chesselet, M.-F., & Taché, Y. (2008). Abnormal colonic motility in mice overexpressing human wild-type α -synuclein. *Neuroreport*, 19(8), 873–876.

Wang L, Magen I, Yuan PQ, Subramaniam SR, Richter F, Chesselet MF, Taché Y. Mice overexpressing wild-type human α -synuclein display alterations in colonic myenteric ganglia and defecation. *Neurogastroenterol Motil.* 2012 Sep;24(9):e425-36.

Wang W, Meng X, Yang C, Fang D, Wang X, An J, Zhang J, Wang L, Lu T, Ruan HB, Gao Y. Brown adipose tissue activation in a rat model of Parkinson's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2017 Dec 1;313(6):E731-E736.

Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2014 Oct;13(10):1045-60.

Warren MW, Hynan LS, Weiner MF. Leptin and cognition. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2012;33(6):410-5.

Watson MB, Richter F, Lee SK, Gabby L, Wu J, Masliah E, Effros RB, Chesselet MF. Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype α -synuclein. *Exp Neurol.* 2012 Oct;237(2):318-34.

Waxman EA, Giasson BI. Molecular mechanisms of α -synuclein neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jul;1792(7):616-24.

Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT Jr. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*. 1996 Oct 29;35(43):13709-15.

Wersinger C, Sidhu A. Attenuation of dopamine transporter activity by α -synuclein. *Neurosci Lett*. 2003 Apr 17;340(3):189-92.

Wiegandt H. The chemical constitution of gangliosides of the vertebrate nervous system. *Behav Brain Res*. 1995 Jan 23;66(1-2):85-97.

Williams DR, Litvan I. Parkinsonian syndromes. *Continuum [Minneapolis, Minn]*. 2013 Oct;19[5 Movement Disorders]:1189-212.

Wills AM, Pérez A, Wang J, Su X, Morgan J, Rajan SS, Leehey MA, Pontone GM, Chou KL, Umeh C, Mari Z, Boyd J; NINDS Exploratory Trials in Parkinson Disease (NET-PD) Investigators. Association Between Change in Body Mass Index, Unified Parkinson's Disease Rating Scale Scores, and Survival Among Persons With Parkinson Disease: Secondary Analysis of Longitudinal Data From NINDS Exploratory Trials in Parkinson Disease Long-term Study 1. *JAMA Neurol*. 2016 Mar;73(3):321-8.

Wilms H, Rosenstiel P, Romero-Ramos M, Arlt A, Schäfer H, Seegert D, Kahle PJ, Odoy S, Claasen JH, Holzkecht C, Brandenburg LO, Deuschl G, Schreiber S, Kirik D, Lucius R. Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and attenuates neuronal cell death induced by α -synuclein protofibrils. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009 Oct-Dec;22(4):897-909.

Winder-Rhodes SE, Evans JR, Ban M, Mason SL, Williams-Gray CH, Foltynie T, Duran R, Mencacci NE, Sawcer SJ, Barker RA. Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort. *Brain*. 2013 Feb;136(Pt 2):392-9.

Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA, Lichtenberg M, Menzies FM, Ravikumar B, Imarisio S, Brown S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol*. 2010 Sep 20;190(6):1023-37.

Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, Morrison A, Lwin A, Colegial C, Allman JM, Schiffmann R. Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab*. 2004 Jul;82(3):192-207.

Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition*. 2000 Oct;16(10):894-902.

Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, Hodge CL, Haase J, Janes J, Huss JW 3rd, Su AI. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol*. 2009;10(11):R130.

Xiong, W.X., Sun, Y.M., Guan, R.Y., Luo, S.S., Chen, C., An, Y., Wang, J., Wu, J.J., 2016. The heterozygous A53T mutation in the alpha-synuclein gene in a Chinese Han patient with Parkinson disease: case report and literature review. *J. Neurol*. 263, 1984–1992.

- Xu YH, Sun Y, Ran H, Quinn B, Witte D, Grabowski GA. Accumulation and distribution of α -synuclein and ubiquitin in the CNS of Gaucher disease mouse models. *Mol Genet Metab*. 2011 Apr;102(4):436-47.
- Yamada T, McGeer PL, Baimbridge KG, McGeer EG. Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. *Brain Res*. 1990 Sep 3;526(2):303-7.
- Yang LJ, Zeller CB, Shaper NL, Kiso M, Hasegawa A, Shapiro RE, Schnaar RL. Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 23;93(2):814-8.
- Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, Roberts AJ, Hannun YA, Samad F. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jul;297(1):E211-24.
- Yap TL, Gruschus JM, Velayati A, Westbroek W, Goldin E, Moaven N, Sidransky E, Lee JC. A-synuclein interacts with Glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. *J Biol Chem*. 2011 Aug 12;286(32):28080-8.
- Yap TL, Velayati A, Sidransky E, Lee JC. Membrane-bound α -synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 2013 Jan;108(1):56-64.
- Yim, Y.I., Sun, T., Wu, L.G., Raimondi, A., De Camilli, P., Eisenberg, E., Greene, L.E., 2010. Endocytosis and clathrin-uncoating defects at synapses of auxilin knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4412–4417.
- Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jan;12(1):9-14.
- Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl:S440-5.
- Zabrocki P, Bastiaens I, Delay C, Bammens T, Ghillebert R, Pellens K, De Virgilio C, Van Leuven F, Winderickx J. Phosphorylation, lipid raft interaction and traffic of α -synuclein in a yeast model for Parkinson. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct;1783(10):1767-80.
- Zahran AM, Eltayeb AA, Elsayh KI, Saad K, Ahmad FA, Ibrahim AIM. Activated and Memory T Lymphocytes in Children with Gaucher Disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017 Jun;65(3):263-269.
- Zarate YA, Hopkin RJ. Fabry's disease. *Lancet*. 2008 Oct 18;372(9647):1427-35.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yebenes JG. The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*. 2004 Feb;55(2):164-73.
- Zech M, Nübling G, Castrop F, Jochim A, Schulte EC, Mollenhauer B, Lichtner P, Peters A, Gieger C, Marquardt T, Vanier MT, Latour P, Klünemann H, Trenkwalder C, Diehl-Schmid J,

Pernecky R, Meitinger T, Oexle K, Haslinger B, Lorenzl S, Winkelmann J. Niemann-Pick C disease gene mutations and age-related neurodegenerative disorders. *PLoS One*. 2013 Dec 30;8(12):e82879.

Zella SMA, Metzdorf J, Ciftci E, Ostendorf F, Muhlack S, Gold R, Tönges L. Emerging Immunotherapies for Parkinson Disease. *Neurol Ther*. 2018 Dec 11.

Zhang S, Xiao Q, Le W. Olfactory dysfunction and neurotransmitter disturbance in olfactory bulb of transgenic mice expressing human A53T mutant α -synuclein. *PLoS One*. 2015 Mar 23;10(3):e0119928.

Zhou TT, Zu G, Wang X, Zhang XG, Li S, Liang ZH, Zhao J. Immunomodulatory and neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 in the MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) -induced mouse model of Parkinson's disease. *Int Immunopharmacol*. 2015 Dec;29(2):334-343.

Zhou T, Zhu M, Liang Z. (-)-Epigallocatechin-3-gallate modulates peripheral immunity in the MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Mol Med Rep*. 2018 Apr;17(4):4883-4888.

Zhuang, X., Oosting, R. S., Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Miller, G. W., Caron, M. G., & Hen, R. (2001). Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1982–1987.

Zigmond MJ, Berger TW, Grace AA, Stricker EM. Compensatory responses to nigrostriatal bundle injury. Studies with 6-hydroxydopamine in an animal model of Parkinsonism. *Mol Chem Neuropathol*. 1989 Jun;10(3):185-200.

Zigmond E, Preston S, Pappo O, Lalazar G, Margalit M, Shalev Z, Zolotarov L, Friedman D, Alper R, Ilan Y. Beta-glucosylceramide: a novel method for enhancement of natural killer T lymphocyte plasticity in murine models of immune-mediated disorders. *Gut*. 2007 Jan;56(1):82-9.

ANNEXES

I Communications écrites

Cuvelier E, Carrié H, Sibran W, Méquinion M, Semaille P, Comptdaer T, Viltart O, Van Besien C, Gressier B, Chartier-Harlin MC, Belarbi K. A-synuclein accumulation and metabolic abnormalities in a mouse model of early stages of Parkinson's disease. AD PD therapeutics, Turin, Italie, 14-18 Mars 2018.

Cuvelier E, Sibran W, Carrié H, Phan C, Jouy N, Pinçon C, Semaille P, Comptdaer T, Van Besien C, Gressier B, Chartier-Harlin MC, Belarbi K. Modulation of glucocerebrosidase activity in a transgenic mouse model overexpressing human α -synuclein. Journée Andrée Verbert, Lille, France, 14 septembre 2017.

Cuvelier E, Méquinion M, Semaille P, Comptdaer T, Sibran W, Jouy N, Goossens J-F, Gressier B, Chartier-Harlin M-C, Belarbi K. Metabolic alterations and inflammation in transgenic mice overexpressing wild-type human α -synuclein. *PhD Student day*, Lille, France, 19 avril 2016.

Cuvelier E, Jouy N, Semaille P, Gressier B, Chartier-Harlin MC, Belarbi K. Multicolor flow cytometry for the analysis of peripheral immune cells recruitment in mouse models of neurodegenerative disorders. *Dementia in Neurological and Mental Diseases meeting*, Lille, France, 16 novembre 2015.

Cuvelier E, Mequinion M, Stievenard A, Caron E, Taillieu D, Viltart O, Vanbesien-Mailliot C, Gressier B, Destée A, Chartier-Harlin MC, Belarbi K. Metabolic abnormalities in mice overexpressing α -synuclein, a model of early stages Parkinson's disease. *Dementia in Neurological and Mental Diseases meeting*, Lille, France, 5-6 juin 2015.

II Communications orales

Cuvelier E, Sibran W, Carrié H, Phan C, Leghay C, Von Gerichten J, Sandhoff R, Nordström V, Comptdaer T, Semaille P, Jouy N, Laloux C, Goossens JF, Vanbesien-Mailliot C, Pinçon C, Gressier B, Destée A, Chartier-Harlin M-C, Belarbi K. Inhibition of glucocerebrosidase activity in a transgenic mouse model overexpressing α -synuclein. *Physiopathology of Parkinson's disease*, Lille, France, 23-24 avril 2018.

Cuvelier E, Leghay C, Carrié H, Méquinion M, Sibran W, Jouy N, Comptdaer T, Semaille P, Pinçon C, Vanbesien-Mailliot C, Caron E, Laloux C, Gressier B, Chartier-Harlin MC, Belarbi K. Modulation of glucocerebrosidase activity in a transgenic mouse model overexpressing human α -synuclein. *PhD Student Day*, Lille, France, 12 mars 2018.

Cuvelier E, Carrié H, Méquinion M, Sibran W, Semaille P, Comptdaer T, Viltart O, Van Besien C, Destée A, Gressier B, Chartier-Harlin MC, Belarbi K. Metabolic disorders in a transgenic mouse model of Parkinson's disease early stages. *LARC neurosciences*, Lille, France, 13 Octobre 2017.

Cuvelier E, Sibran W, Jouy N, Phan C, Carrié H, Semaille P, Comptdaer T, Van Besien C, Gressier B, Chartier-Harlin MC, Belarbi K. Modulation of glucocerebrosidase activity in a transgenic mouse model overexpressing human α -synuclein. PhD Student Day, Lille, France, 21 mars 2017.

III Articles

Cuvelier E, Méquinion M, Leghay C, Sibran W, Stievenard A, Sarchione A, Bonte MA, Vanbesien-Mailliot C, Viltart O, Saitoski K, Caron E, Labarthe A, Comptdaer T, Semaille P, Carrié H, Mutez E, Gressier B, Destée A, Chartier-Harlin MC, Belarbi K. Overexpression of Wild-Type Human A-Synuclein Causes Metabolism Abnormalities in Thy1-aSYN Transgenic Mice. *Front Mol Neurosci*. 2018 Oct 2;11:321.



Overexpression of Wild-Type Human Alpha-Synuclein Causes Metabolism Abnormalities in Thy1-aSYN Transgenic Mice

Elodie Cuvelier¹, Mathieu Méquinion¹, Coline Leghay¹, William Sibran¹, Aliçia Stievenard¹, Alessia Sarchione¹, Marie-Amandine Bonte¹, Christel Vanbesien-Mailliot¹, Odile Viltart¹, Kevin Saitoski¹, Emilie Caron¹, Alexandra Labarthe², Thomas Comptdaer¹, Pierre Semaille¹, Hélène Carrié¹, Eugénie Mutez¹, Bernard Gressier¹, Alain Destée¹, Marie-Christine Chartier-Harlin^{1*} and Karim Belarbi^{1†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Fredric P. Manfredsson,
Michigan State University,
United States

Reviewed by:

Maria Xilouri,
Biomedical Research Foundation
of the Academy of Athens, Greece
Charles Harrington,
University of Aberdeen,
United Kingdom
Hong Qing,
Beijing Institute of Technology, China

*Correspondence:

Marie-Christine Chartier-Harlin
marie-christine.chartier-
harlin@inserm.fr

[†] These authors have contributed
equally to this work

Received: 01 April 2018

Accepted: 17 August 2018

Published: 02 October 2018

Citation:

Cuvelier E, Méquinion M, Leghay C, Sibran W, Stievenard A, Sarchione A, Bonte M-A, Vanbesien-Mailliot C, Viltart O, Saitoski K, Caron E, Labarthe A, Comptdaer T, Semaille P, Carrié H, Mutez E, Gressier B, Destée A, Chartier-Harlin M-C and Belarbi K (2018) Overexpression of Wild-Type Human Alpha-Synuclein Causes Metabolism Abnormalities in Thy1-aSYN Transgenic Mice. *Front. Mol. Neurosci.* 11:321. doi: 10.3389/fnmol.2018.00321

¹ UMR-S 1172, Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, Inserm, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Université de Lille, Lille, France, ² UMR 894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Inserm, Université Paris Descartes, Paris, France

Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by loss of dopaminergic neurons, pathological accumulation of alpha-synuclein and motor symptoms, but also by non-motor symptoms. Metabolic abnormalities including body weight loss have been reported in patients and could precede by several years the emergence of classical motor manifestations. However, our understanding of the pathophysiological mechanisms underlying body weight loss in PD is limited. The present study investigated the links between alpha-synuclein accumulation and energy metabolism in transgenic mice overexpressing Human wild-type (WT) alpha-synuclein under the Thy1 promoter (Thy1-aSYN mice). Results showed that Thy1-aSYN mice gained less body weight throughout life than WT mice, with significant difference observed from 3 months of age. Body composition analysis of 6-month-old transgenic animals showed that body mass loss was due to lower adiposity. Thy1-aSYN mice displayed lower food consumption, increased spontaneous activity, as well as a reduced energy expenditure compared to control mice. While no significant change in glucose or insulin responses were observed, Thy1-aSYN mice had significantly lower plasmatic levels of insulin and leptin than control animals. Moreover, the pathological accumulation of alpha-synuclein in the hypothalamus of 6-month-old Thy1-aSYN mice was associated with a down-regulation of the phosphorylated active form of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and of Rictor (the mTORC2 signaling pathway), known to couple hormonal signals with the maintenance of metabolic and energy homeostasis. Collectively, our results suggest that (i) metabolic alterations are an important phenotype of alpha-synuclein overexpression in mice and that (ii) impaired STAT3 activation and mTORC2 levels in the hypothalamus may underlie the disruption of feeding regulation and energy metabolism in Thy1-aSYN mice.

Keywords: body weight, energy metabolism, insulin, leptin, mTOR, neurodegeneration, parkinsonism, transcription factor STAT3

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the most common movement neurodegenerative disorder in elderly adults. It is characterized by a progressive degeneration of dopaminergic neurons in the *substantia nigra* and by the pathological accumulation of intraneuronal aggregated and hyperphosphorylated alpha-synuclein in Lewy bodies (Bridi and Hirth, 2018). Missense mutations and multiplication of the gene encoding alpha-synuclein SNCA (synuclein, alpha [non-A4 component of amyloid precursor]) were identified as genetic abnormalities associated with rare familial forms of PD (Polymeropoulos et al., 1997; Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004; Ibanez et al., 2004). Polymorphisms regulating SNCA levels were subsequently associated with sporadic PD (Maraganore et al., 2006; Simon-Sanchez et al., 2009), supporting that alpha-synuclein level is instrumental in most forms of the disease. Dopamine deficit at the striatum -e.g., the striatal area innervated by the *substantia nigra*- is the main factor leading to bradykinesia, resting tremor, rigidity and postural instability. It is generally accepted that these motor symptoms appear only after a substantial proportion of dopaminergic neurons are lost (Bezard et al., 2001).

The motor features of PD can be preceded, sometimes for several years, by non-motor symptoms such as olfactory deficits, sleep disorders, depression and autonomic dysfunction (Schapira et al., 2017). Increasing evidence suggests that unintended body weight change is also a significant feature of PD symptomatology. Weight loss, primarily due to fat rather than muscle loss (Markus et al., 1993), has been frequently documented in PD patients (Chen et al., 2003; Cheshire and Wszolek, 2005; Uc et al., 2006; van der Marck et al., 2012). The majority of patients have lower body mass than control individuals at diagnosis (Sharma and Lewis, 2017). PD patients are moreover four times more likely to lose body mass than healthy elderly individuals (Chen et al., 2003; Cheshire and Wszolek, 2005; Uc et al., 2006; van der Marck et al., 2012; Cumming et al., 2017). Body mass loss during the course of the disease has been associated with poorer clinical outcomes and rapid disease progression (Lorefalt et al., 2004; van der Marck et al., 2012; Sharma and Vassallo, 2014; Pak et al., 2018), suggesting that it could be of prognostic significance for PD severity (Cumming et al., 2017; Sharma and Lewis, 2017; Pak et al., 2018). Thus, to address the links between weight loss and PD is quite necessary (Ma et al., 2018).

Body weight is governed by energy intake and energy expenditure (EE), which are tightly controlled as peripheral hormonal signals integrate in the hypothalamus to regulate food intake and energy outgo (Schwartz et al., 2000). Reduced energy intake, secondary to motor or non-motor symptoms (i.e., hyposmia, gastrointestinal disturbance, depression) has been proposed as a factor contributing to weight loss in PD (Ma et al., 2018). However, other studies showed that mild to moderate PD patients have the same nutritional status compared to controls (Fereshtehnejad et al., 2014) or that weight loss can occur in PD despite an increased energy intake (Chen et al., 2003; Lorefalt et al., 2004). Conflicting results also exist regarding EE, with a study suggesting that increased EE could

contribute to weight loss in PD (Markus et al., 1992) while others showed that the total daily EE was not higher in patients with weight loss compared with patients without weight loss (Delikanaki-Skaribas et al., 2009) and healthy controls (Jorgensen et al., 2012). Central regulatory hypothalamic mechanisms in weight disturbance in PD has recently attracted much attention in part due reports of body weight gain after deep brain stimulation of subthalamic nuclei (Bannier et al., 2009; Aiello et al., 2017). Moreover, changes in plasmatic concentrations of hormones regulating energy balance such as leptin occur in PD patients with weight loss (Fischer et al., 2010). However, our basic understanding of the pathophysiological mechanisms underlying body weight change in PD remains limited. In particular it is not known whether alpha-synuclein accumulation that is central in PD impacts on energy intake/expenditure, levels of peripheral hormones or changes in global function of the hypothalamus.

In the present study, we determined the metabolic phenotype of the well-established Thy1-aSYN mouse model of PD. Thy1-aSYN transgenic mice overexpress full-length Human wild-type (WT) alpha-synuclein under the murine Thy-1 (thymus cell antigen 1, theta) promoter (Thy1-aSYN mice) (Chesselet et al., 2012). We measured the evolution of body mass from weaning to 12 months of age and assessed in 6-month-old (an age preceding any severe motor deficits) animals food intake, spontaneous activity, EE, glucose, and insulin tolerance, as well as alpha-synuclein, insulin, and leptin in the plasma and related signaling pathways in the hypothalamus.

MATERIALS AND METHODS

Animal Procedures

This research was conducted in accordance with the European Union standards for the care and use of laboratory animals and approved by the Nord/Pas-de-Calais Ethical Committee CEEA N°75 (authorization n° O535.02). Thy1-aSYN mice (on a C57Bl6/DBA2 background) were provided by Pr. Marie-Françoise Chesselet (University of California Los Angeles, CA, United States) with the agreement of Prof. Eliezer Masliah (University of California San Diego, CA, United States) and a colony was established in Lille animal facility by breeding transgenic females with WT males (Charles Rivers). Animals were genotyped by PCR from tail DNA samples. Thy1-aSYN and WT littermates male mice were used in the study. Animals were maintained in standard animal cages under specific pathogen-free conditions (12/12 h light/dark cycle; 22°C; grouped housed), with *ad libitum* access to water and standard laboratory chow (RM1A; 14.8 MJ/kg; Special Diets Services). Body weights were measured for different animals housed in our colony, including but not limited to those euthanized for further analyses, at weaning (WT: $n = 17$, Thy1-aSYN: $n = 17$), 2 months (WT: $n = 17$, Thy1-aSYN: $n = 17$), 3 months (WT: $n = 27$, Thy1-aSYN: $n = 25$), 6 months (WT: $n = 33$, Thy1-aSYN: $n = 29$), 9 months (WT: $n = 10$, Thy1-aSYN: $n = 9$) and 12 months (WT: $n = 10$, Thy1-aSYN: $n = 7$) of age. Further behavioral and metabolic

characterizations were performed on 6-month-old animals (WT: $n = 22$, Thyl- α SYN: $n = 19$) or 3-month-old animals (WT: $n = 16$, Thyl- α SYN: $n = 13$). Beam test was performed on 6-month-old animals and lasted 3 days, as described below. The following week, metabolic analyses were carried out using metabolic cages (see below) and glucose tolerance and insulin sensitivity tests were performed (see below). The body compositions were assessed on 12 WT and 10 Thyl- α SYN 6-month-old mice. For blood and plasma analyses, mice were fasted during 6 h before being euthanized. Trunk blood samples were gathered in heparinized tubes and centrifuged at 425 g for 10 min at 4°C. Plasma supernatant was aliquoted and stored at -70°C until assayed. Brains were rapidly removed, hypothalamus dissected out at 4°C and stored at -70°C until use. Inguinal and gluteal adipose tissue were weighted as subcutaneous adipose tissue. The same experimenter dissected all samples for consistency.

Challenging Beam Traversal Test

Motor performance and coordination were measured using a challenging beam traversal procedure (Fleming et al., 2013). Briefly, animals were trained for 2 days in the afternoon to traverse the length of a beam toward their home cage. On the third day, a mesh grid (1 cm squares) was positioned 1 cm above the beam. Mice were then videotaped for a total of five trials. An experimenter blind to genotype watched and rated the videotapes for errors, number of steps made by each animal, and time to traverse for all five trials. An error was counted when, during a forward movement, a limb slipped through the grid and was visible between the grid and the beam surface (Fleming et al., 2013).

Body Composition

Body composition was determined using an "in vivo Micro-CT Scanner for Small Lab Animals" (LaTheta I.C.T-100, Hitachi Aloka Medical Ltd.). Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) mix and about 60 CT slices per mouse were made at 500 μ m intervals between shoulders and posterior legs. Slices were analyzed by Aloka software for fat (visceral and subcutaneous) mass, lean mass, and for bone mineral density in the spinal cord. The fat ratio was calculated by the following formula: total fat mass/(total fat mass + lean mass) \times 100.

Metabolism, Ambulatory Activity and Energy Expenditure Monitoring

Mice were individually housed in a LabMaster-CaloSys-Calorimetry System (TSE Systems). Animals were placed 3 days in chambers and only the last 24 h were monitored. The locomotor activity was derived from the number of beam breaks (infrared light-beam frame ActiMot2; x- and z- axes sensors). The system measured the volume of O₂ consumed and the volume of CO₂ produced, over a 15 min period, 4 times per hour. These values were averaged to determine the rate of O₂ consumed (VO₂) and CO₂ produced (VCO₂). The EE, the respiratory exchange ratio (RER), and the fatty acid oxidation (FA) were calculated using the following equations $RER = VCO_2 / VO_2$;

$EE \text{ (kcal/h)} = (3.815 + 1.232 \times RER) \times VO_2 \times 1000$, FA oxidation (kcal/h) = $EE \times ((1-RER)/0.3)$ (Mcquinnion et al., 2015). Values for RER range between 1.0 to 0.7, with pure carbohydrate oxidation having a value of 1.0 and pure fat oxidation having a value of 0.7.

Food Intake Monitoring/Meal Pattern Analysis

Metabolic cages are equipped with food and drink high precision sensors of 0.01 g and 0.01 ml resolution respectively (TSE Systems, GmbH). Mice had free access to food and water during the whole recording period. Here a meal was defined as a consumption of at least 0.03 g of food separated from the next feeding episode by at least 10 min, as previously described (Hassouna et al., 2013). For each mouse, inter-meal interval, meal duration, meal size and meal rate in dark and light phases were assessed.

Intraperitoneal Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity

Intraperitoneal glucose tolerance and insulin sensitivity tests were performed at 2 p.m., after 6 h of fasting. D (+) glucose (1 g/kg in saline; Sigma-Aldrich) or insulin (0.75 units/kg in saline; NovoRapid FlexPen®) were injected intraperitoneally. Blood glucose concentration was measured using a OneTouch Vita³ meter (Lifescan) 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min following injection.

Blood Glucose and Plasmatic Alpha-Synuclein, Insulin and Leptin Levels

Blood glucose levels were quantified after 6 h of fasting using a OneTouch Vita³ meter (Lifescan). Plasma Human alpha-synuclein levels were measured using the Human alpha-Synuclein Kit (Meso Scale Discovery) according to the manufacturer's instructions. Intraassay coefficient of variation was < 14%. Plasma insulin was assayed using the Mercodia Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA (Mercodia). Intra- and interassay coefficients of variation were <3.4 and <3.0%, respectively. Plasma leptin was measured using the Quantikine[®] ELISA kit (R&D Systems). Intra- and interassay coefficients of variation were <4.5 and <4.7%, respectively. All the samples were analyzed in duplicate.

Western-Blot Analyses

Tissue was homogenized in 300 μ l RIPA buffer (Thermo Scientific) containing 0.5% (w/v) CHAPS (Sigma-Aldrich), protease and phosphatase inhibitors (Complete and PhosSTOP, Roche), using a glass/teflon potter homogenizer (30 strokes), sonicated and let under agitation for 1 h at 4°C. Lysates were centrifuged at 12000 \times g for 20 min at 4°C. The supernatant was removed and stored at -20°C. Proteins were quantified using the BCA system (Pierce). Protein samples were prepared in reducing conditions (NuPage sample buffer with sample reducing agent, Invitrogen) and heated at 95°C for 10 min. Then, 10 μ g of proteins were separated

on a NuPAGE Novex gel (Invitrogen) and transferred to a nitrocellulose or PVDF membrane, for chemiluminescent or fluorescent western-blotting respectively. Membranes were saturated in 5% non-fat dry milk in TNT or 5% Bovine Serum Albumine in Tris-NaCl-Tween buffer and incubated with appropriate primary antibodies allowing detection of actin (Sigma-Aldrich A5441, 1/50000), Akt (Cell Signaling 9272, 1/5000), phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling 12694, 1/2500), Human and murine alpha-synuclein (BD Bioscience 610787; immunogen: Rat synuclein-1 aa. 15-123; 1/10000), phospho-alpha-Synuclein (Ser129) (Cell Signaling 23706; immunogen: synthetic phosphopeptide corresponding to residues surrounding Ser129 of Human alpha-synuclein protein; 1/1000), aggregated alpha-synuclein (Merck MABN389; immunogen: Keyhole limpet hemocyanin-conjugated linear peptide corresponding to Human aggregated alpha-synuclein; 1/2000), IRS-1 (Cell Signaling 2382, 1/1000), phospho-IRS1 (Tyr608) (Merck 09-432, 1/5000), LC3B (Abcam ab48394, 1/2500), mTOR (Cell Signaling 2972, 1/1000), phospho-mTOR (Ser2448) (Cell Signaling 2971, 1/2500), p62 (BD Bioscience 610498, 1/5000), Stat3 (Cell Signaling 9139, 1/2500), phospho-Stat3 (Tyr705) (Cell Signaling 9131, 1/1000), Raptor (Cell Signaling 2280, 1/5000) and Rictor (Cell Signaling 2114, 1/5000). Signals were revealed with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies (Life technologies) and chemiluminescence (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, Amersham Biosciences) using Amersham Imager 600 (GE Healthcare), or with fluorescent secondary antibodies (Life technologies) using Typhoon FLA 9500 GoldSeal (GE Healthcare). Two to eight replicates of each western-blot were performed. Quantification of protein bands densitometry was carried out using ImageJ software version 1.51 w (NIH). Results are normalized to actin levels.

Statistics

The difference in body mass between genotypes was compared across time using a Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney *U*-test on individual time period. A Mann-Whitney *U*-test was used to compare WT and Thy1-aSYN mice for a given phase or light and dark phases for a given phenotype. Unless otherwise noted, values in the figures and text are mean \pm standard error of the mean (SEM). Values of $p < 0.05$ are considered to be statistically significant. Data were analyzed and graphs were plotted by GraphPad Prism® software version 6.05.

RESULTS

Thy1-aSYN Mice Show Impaired Motor Performance and Coordination in Challenging Beam Traversal

Six-month-old WT and Thy1-aSYN mice were tested in the challenging beam traversal test (Figure 1A). Time to traverse, number of steps and error per steps were analyzed. Regarding time to traverse, Mann-Whitney *U*-test showed no significant

difference between WT and transgenic mice ($p = 0.67$) (Figure 1B). Similarly, the number of steps did not differ between WT and transgenic mice ($p = 0.28$; data not shown). Analysis of the number of errors per step indicated that transgenic animals made significantly more errors compared to WT controls (0.77 ± 0.05 vs. 0.38 ± 0.03 ; $p < 0.0001$) (Figures 1C,D). Therefore, our results show that 6-month-old Thy1-aSYN display impairments in the challenging beam traversal test, confirming the deficits of this model in challenging motor tests (Fleming et al., 2004; Chesselet et al., 2012).

Thy1-aSYN Mice Show Reduced Body Weight Gain Over Time

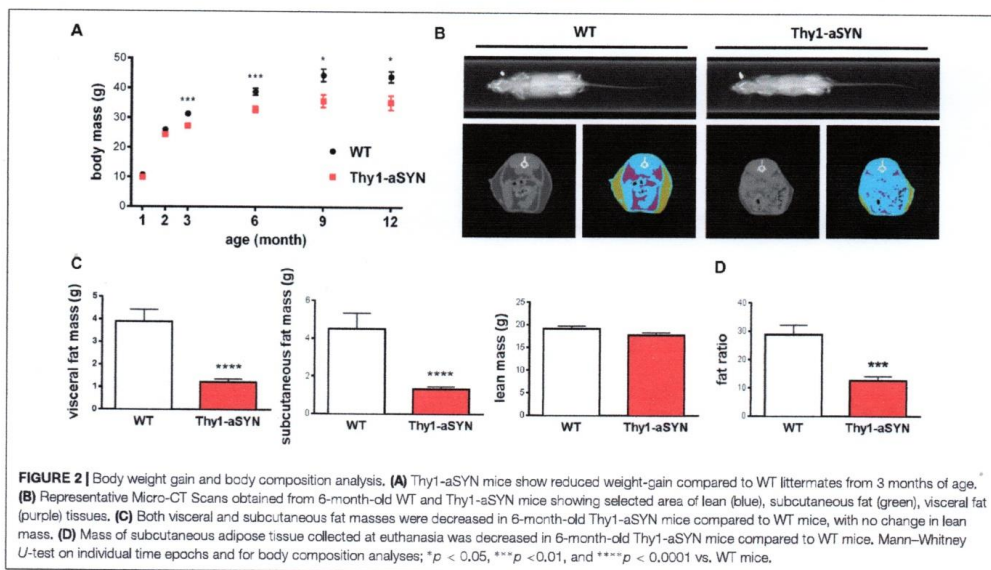
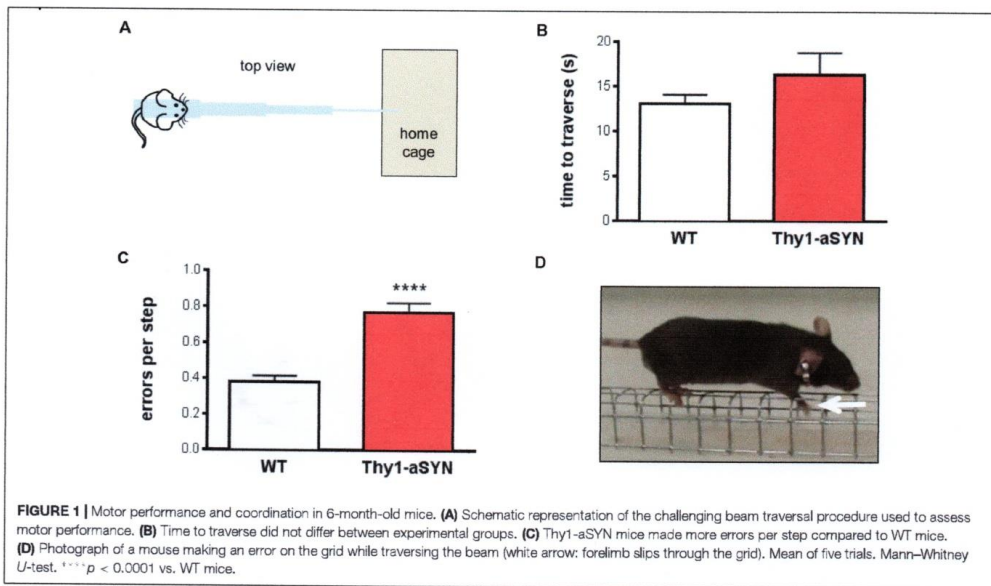
Wild-type and transgenic mice were weighed at 21 days (weaning), 2, 3, 6, 9, and 12 months of age. Kruskal-Wallis analysis showed that both WT and transgenic mice gained weight as they aged ($p < 0.0001$ for both genotype). Mann-Whitney *U*-test on individual time periods revealed that Thy1-aSYN mice weighed significantly less than WT mice from 3 months of age (27.25 ± 0.92 vs. 31.31 ± 0.94 g; $p < 0.001$). Difference increased over time, so that at 12 months of age WT mice reached 42.72 ± 2.13 g, while Thy1-aSYN mice weighed 35.30 ± 2.44 g ($p < 0.05$) (Figure 2A). Therefore, our results suggest a slower body weight gain of Thy1-aSYN transgenic mice compared to WT littermates. Next characterizations were conducted on 6-month-old transgenic Thy1-aSYN and WT mice (body mass: Thy1-aSYN: 32.84 ± 1.03 vs. WT: 38.82 ± 1.13 g; $p < 0.001$).

Thy1-aSYN Mice Have Reduced Body Fat Compared to WT Mice

To explore whether lower body mass of Thy1-aSYN compared to WT mice was attributable to change in body composition, X-ray CT Scan imaging was used to evaluate lean and fat masses in anesthetized 6-month-old mice (Figure 2B). Data analyses revealed no significant difference in lean mass between transgenic and WT mice (Thy1-aSYN: 17.69 ± 0.63 vs. WT: 19.15 ± 0.54 ; $p = 0.11$). In contrast, transgenic mice showed a decrease in the total fat mass (2.54 ± 0.26 vs. 8.39 ± 1.35 g; $p < 0.0001$), visceral fat mass (1.22 ± 0.14 vs. 3.90 ± 0.53 g; $p < 0.0001$), and subcutaneous fat mass (1.32 ± 0.125 vs. 4.49 ± 0.82 g; $p < 0.0001$) compared to WT littermates (Figure 2C). This was accompanied by a decreased fat ratio (Thy1-aSYN: 12.67 ± 1.36 vs. WT: $28.88 \pm 3.29\%$; $p = 0.0001$). Bone mineral density was also calculated and showed no difference between transgenic and WT animals (data not shown). At euthanasia, the weight of subcutaneous adipose tissue (consisting of inguinal and gluteal adipose tissues) was lower in Thy1-aSYN mice compared to that of WT mice (121.1 ± 10.58 vs. 447.4 ± 77.32 mg; $p < 0.001$) (Figure 2D). Therefore, both CT Scan imaging and subcutaneous fat weighting show that Thy1-aSYN mice have a reduced fat accumulation.

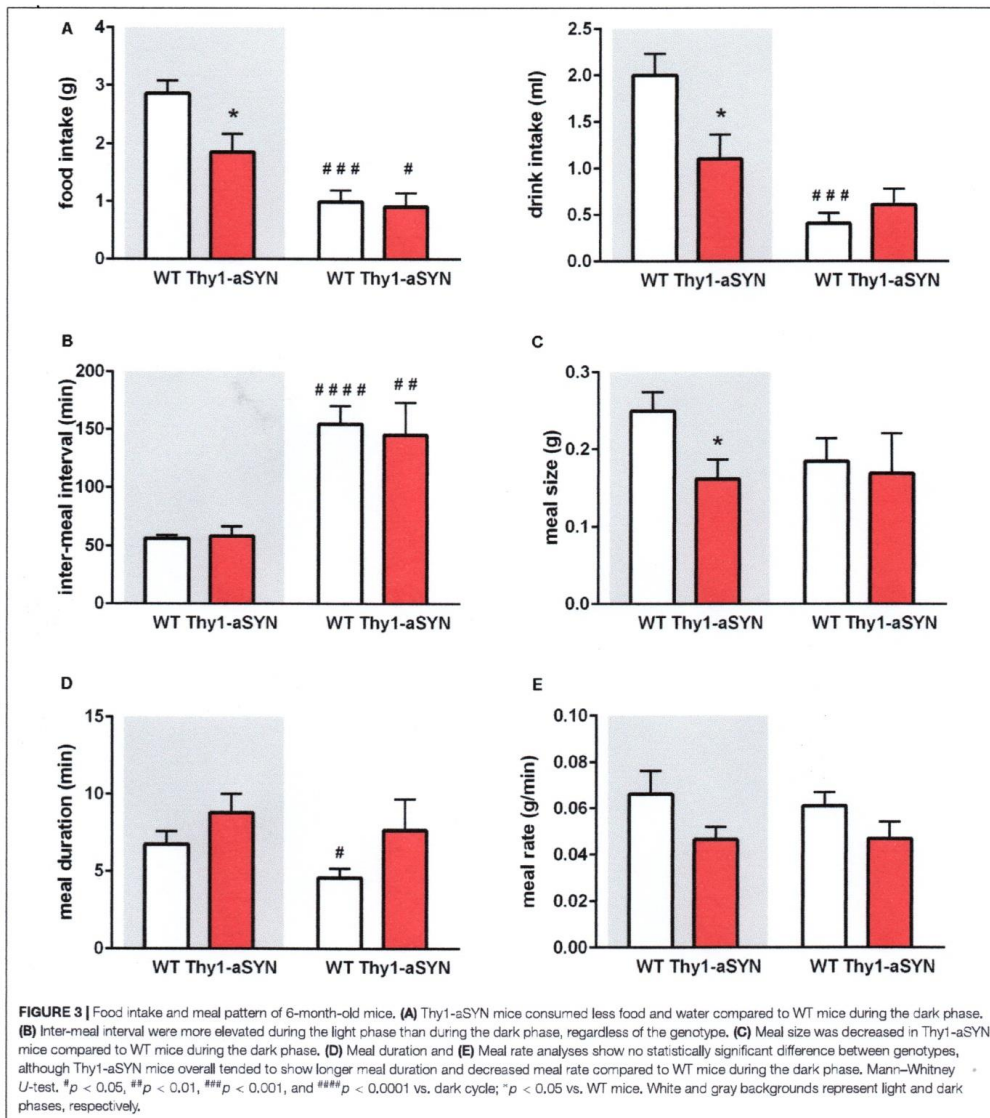
Thy1-aSYN Mice Display Reduced Food Intake and Altered Meal Pattern

To better understand the cause of the lower body weight and body fat in transgenic mice, we examined their food



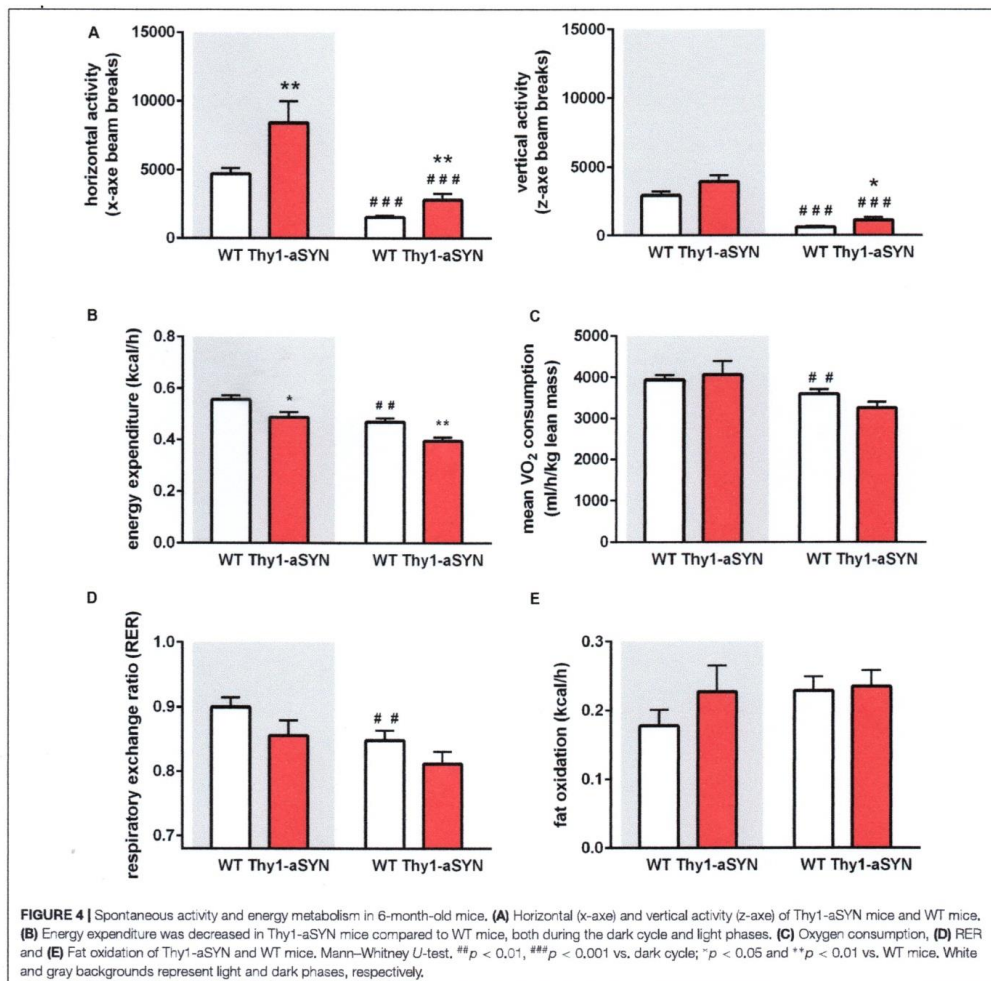
intake, ambulatory activity and EE using the LabMaster-Calorimetry system. Transgenic mice consumed 35% less food than their control littermates during the dark cycle (1.85 ± 0.31 vs. 2.86 ± 0.225 g; $p < 0.05$). This was accompanied by a

lower consumption of water (1.11 ± 0.26 vs. 2.00 ± 0.23 ml; $p < 0.05$) (Figure 3A). Further analyses were performed to compare the inter-meal interval, meal size, meal duration and meal rate. Inter-meal interval analysis revealed no difference



between transgenic and WT mice and both genotypes showed a more elevated inter-meal interval during the light phase than during the dark phase (Figure 3B). Measurement of the meal size showed that it was decreased in Thy1-aSYN mice compared to WT mice during the dark phase (0.162 ± 0.025 vs. 0.250 ± 0.025 g; $p < 0.05$) (Figure 3C). Thy1-aSYN

mice also tended to show a longer meal duration and a decreased meal rate compared to WT mice, although these differences did not reach statistical significance (Figures 3D,E). It however has to be noted that the meal duration was statistically shorter during the light cycle compared to the dark cycle for WT animals (4.58 ± 0.59 vs. 6.73 ± 0.85 min;

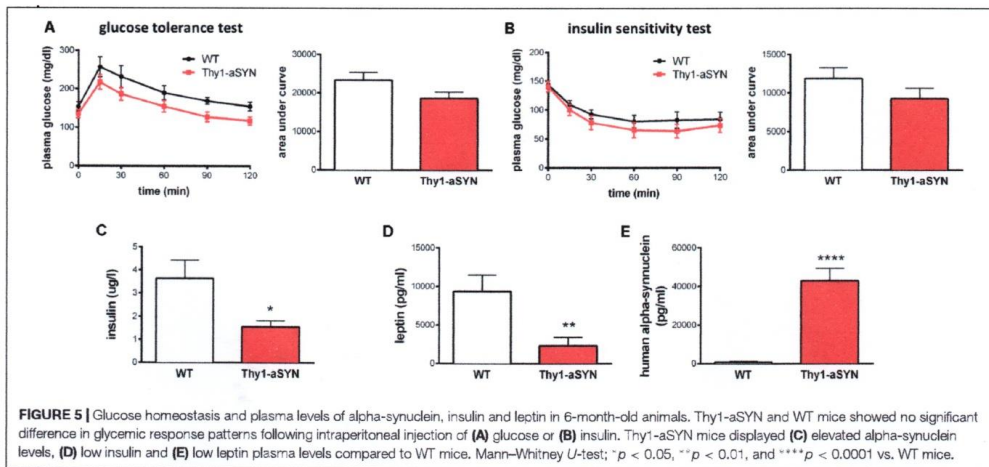


$p < 0.05$), but this was not the case for transgenic animals (Figure 3D).

Thy1-aSYN Mice Show Increased Activity and Altered Energy Metabolism

The monitoring of locomotor activity showed that the horizontal ambulatory activity (x-axis beam breaks counts; e.g., locomotion) of Thy1-aSYN mice was significantly higher than that of WT mice both during the dark cycle (8425 ± 1552 vs. 4731 ± 401 breaks; $p < 0.05$) and during the light cycle (2828 ± 446 vs. 1558 ± 132 breaks; $p = p < 0.01$). Likewise, the vertical

activity (z-axis beam breaks counts; e.g., rearing or jumping) was significantly increased during the light cycle (1128 ± 218 vs. 620 ± 101 breaks; $p < 0.05$) (Figure 4A). The measurement of the EE using the LabMaster-Calorimetry system showed that EE was decreased in Thy1-aSYN mice compared to WT mice, both during the dark cycle (0.49 ± 0.02 vs. 0.56 ± 0.02 kcal/h; $p < 0.05$) and during the light cycle (0.40 ± 0.01 vs. 0.47 ± 0.02 kcal/h; $p < 0.01$) (Figure 4B). Body composition influences energy metabolism, and there is no consensus on the best normalization tool to use when expressing VO_2 or VCO_2 (Butler and Kozak, 2010; Kaiyala et al., 2010). In our study, we observed no statistically significant change



in oxygen consumption or carbon dioxide production between transgenic and WT mice, when normalized to either lean mass or total body weight (Figure 4C and data not shown). However, our results show that oxygen consumption was decreased during the light cycle compared to the dark cycle for WT animals (3604 ± 110 vs. 3940 ± 115 ml/h/kg lean mass; $p < 0.01$), while this was not the case for the transgenic animals (Figure 4C). Similarly, the RER was significantly decreased during the light cycle compared to the dark cycle in WT animals (0.848 ± 0.015 vs. 0.900 ± 0.014 ; $p < 0.01$) but no such difference was observed in Thy1-aSYN mice (Figure 4D). Altogether these data suggest that temporal rhythms in energy metabolism may be deregulated in Thy1-aSYN mice. Finally, as the Thy1-aSYN transgenic mice have lower body fat mass than WT mice, we calculated the fat oxidation to better evaluate their use of fat as intrinsic energy source. Our results did not reveal significant difference for this parameter between genotypes (dark cycle: Thy1-aSYN: 0.23 ± 0.04 vs. WT: 0.18 ± 0.02 kcal/h; $p = 0.485$; light cycle: Thy1-aSYN: 0.235 ± 0.02 vs. WT: 0.23 ± 0.02 ; $p = 0.74$) (Figure 4E).

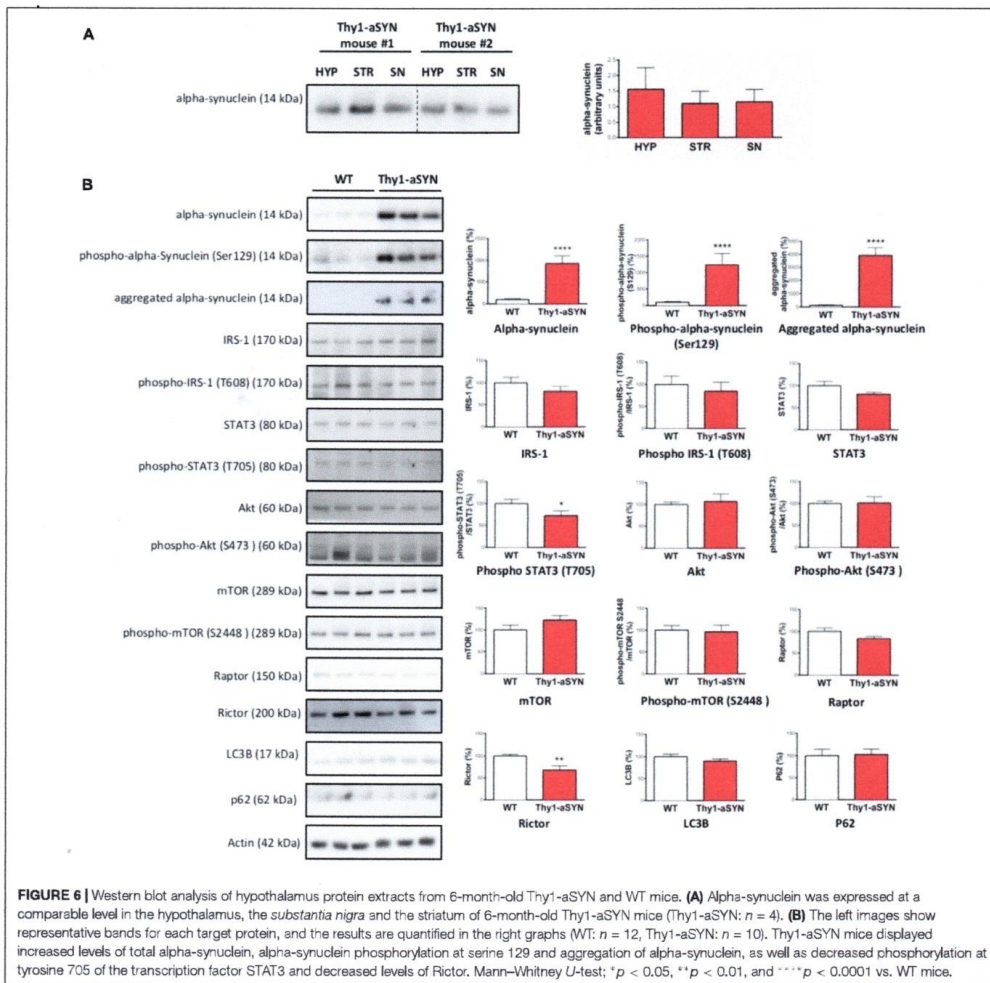
Thy1-aSYN Mice Have Decreased Insulin and Leptin Plasma Levels

Given the change in body weight, fat mass, food consumption, spontaneous activity and EE, we first examined blood glucose levels after 6 h of fasting and observed no significant difference between Thy1-aSYN and WT mice (TR: 160.0 ± 9.75 vs. WT: 172.5 ± 8.32 mg/dl; $p = 0.4732$). To assess whole-body glucose homeostasis, we next performed intraperitoneal glucose tolerance test and insulin sensitivity test on these mice. We detected no differences in the response patterns, with comparable area under the curve for Thy1-aSYN and WT mice in both tests (Figures 5A,B). We also measured the plasma levels of insulin and leptin and showed decreased levels of these two

hormones in Thy1-aSYN mice compared to WT mice (insulin: 1.56 ± 0.27 vs. 3.64 ± 0.78 μ g/l; $p < 0.05$; leptin: 2331 ± 1103 vs. 9348 ± 2163 pg/ml; $p < 0.01$) (Figures 5C,D). Finally, the presence of Human alpha-synuclein was detected in the plasma of transgenic mice but not in the plasma of WT mice (42960 ± 6305 pg/ml; $p < 0.0001$ vs. WT mice) (Figure 5E).

Thy1-aSYN Mice Display Decreased STAT3 Phosphorylation and Rictor Level in the Hypothalamus

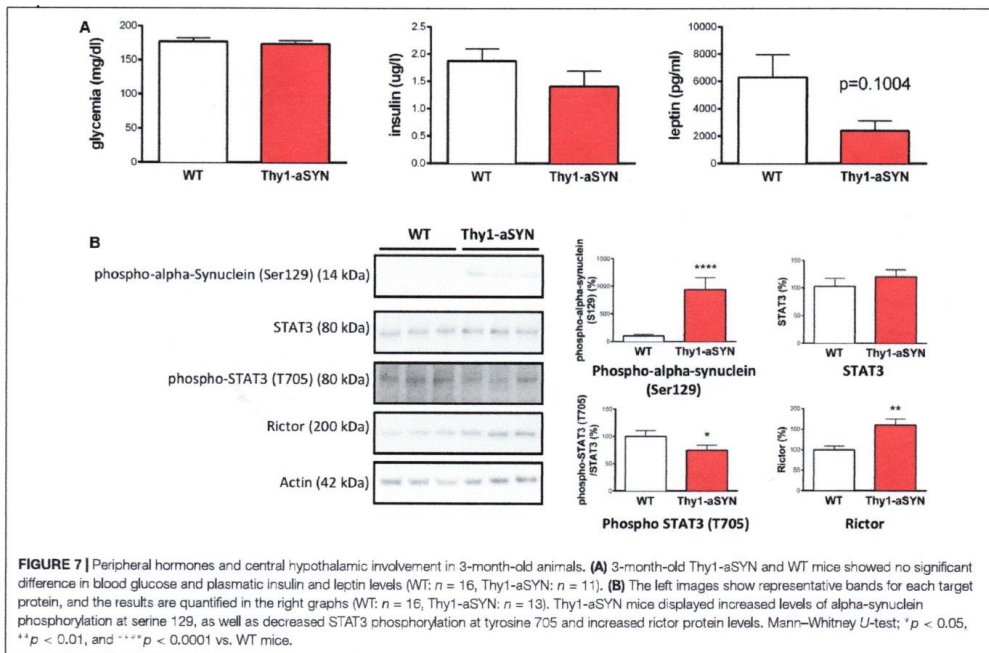
The control of feeding and EE is centrally regulated by the hypothalamus using the information originating from peripheral organs. To determine whether alterations in this brain region could contribute to the metabolic abnormalities in Thy1-aSYN mice, we first evaluated the accumulation of alpha-synuclein in the hypothalamus in our model. We found that alpha-synuclein, detected with an antibody that recognizes both mouse and Human proteins, was expressed in the hypothalamus at a level comparable to that observed in the substantia nigra and the striatum in 6-month-old Thy1-aSYN mice (Figure 6A). Further analyses showed that levels of total alpha-synuclein, alpha-synuclein phosphorylation at serine 129 and aggregated alpha-synuclein were higher in the hypothalamus of Thy1-aSYN mice compared to WT mice (928.5 ± 169.7 vs. $100 \pm 17.38\%$; $p < 0.0001$; 1243.1 ± 335.8 vs. $100 \pm 21.36\%$; $p < 0.0001$ and 4133.72 ± 638.6 vs. $100 \pm 38.56\%$; $p < 0.0001$, respectively) (Figure 6B). We next compared the expression and activation of receptors and protein complexes known to be critically implicated in the regulation of energy balance and metabolism by the hypothalamus. Western blot of total and active phosphorylated forms of IRS-1 and of STAT3 showed that phosphorylation of STAT3 at tyrosine 705 was decreased in the hypothalamus of 6-month-old Thy1-aSYN mice compared to WT mice (71.84 ± 10.51 vs. $100 \pm 9.70\%$; $p < 0.05$) (Figure 6B).



We also compared the major mTOR protein complexes including total and phosphorylated mTOR (that nucleates the two distinct protein complexes mTORC1 and mTORC2), raptor (specific core regulatory protein of the mTORC1 complex) or rictor (specific core regulatory protein of the mTORC2 complex). Obtained data show a significant decrease in the expression of rictor in the hypothalamus of 6-month-old Thy1-aSYN mice (67.97 ± 9.68 vs. $100 \pm 3.66\%$; $p < 0.01$), suggesting that the mTORC2 pathway is deregulated in 6-month-old Thy1-aSYN mice (Figure 6B). Given that rictor plays an important role in autophagy induction and that alpha-synuclein is known to alter autophagy signals, the levels of key autophagy-related proteins

LC3B and p62 were assessed but showed no significant changes between Thy1-aSYN and WT mice (89.68 ± 4.96 vs. $100 \pm 5.76\%$; $p = 0.27$ and 102.9 ± 11.47 vs. $100 \pm 13.71\%$; $p = 0.64$, respectively).

Finally, we aimed to see whether the deregulation of markers linked to metabolism was observed at an earlier time-point in the Thy1-aSYN mouse model. We therefore compared the phenotype of 3-month-old transgenic and WT animals for both peripheral and central markers previously identified as deregulated. Our results show no change in blood glucose levels and insulinemia and a non-statically decrease of the plasmatic levels of leptin in 3-month-old Thy1-aSYN mice compared to



controls (2416 ± 699 vs. 6273 ± 1670 pg/ml; $p = 0.1004$) (Figure 7A). They moreover evidence in 3-month-old Thy1-aSYN mice increased levels of alpha-synuclein phosphorylated at serine 129 (935.5 ± 218.2 vs. $100 \pm 26.60\%$; $p < 0.0001$) together with a decrease in the phosphorylation of STAT3 at tyrosine 705 (75.24 ± 9.06 vs. $100 \pm 10.74\%$; $p < 0.05$) and an increase in rictor protein levels (160.6 ± 14.48 vs. $100 \pm 9.08\%$; $p < 0.01$) (Figure 7B).

DISCUSSION

The present study aimed to characterize the metabolic phenotype of the Thy1-aSYN mouse model based on the overexpression of full-length, Human, WT alpha-synuclein. The Thy1-aSYN mouse model reproduces several features evoking sporadic PD, such as alpha-synuclein accumulation in brain regions including the substantia nigra. Later in life - at 14 months of age - these mice lose 40% of striatal dopamine and show sensory-motor deficits that, as in Humans, are partially reversed by L-dopa (Lam et al., 2011). This pathological phenotype may be slower than that of mice that overexpress alpha-synuclein carrying mutations found in patients with rare familial forms of PD (i.e., A53T, A30P) (Chesselet and Richter, 2011). In the present study, we characterized the transgenic mice at an age preceding any dopamine loss and severe sensory-motor deficits (Chesselet et al., 2012) in an attempt to improve our

understanding at an earlier phase of the disorder. Consistent with previous publications (Fleming et al., 2004; Lam et al., 2011) we report motor deficits in the challenging beam traversal test, therefore supporting the reproducibility of the Thy1-aSYN phenotype. Our data show for the first time that 6-month-old Thy1-aSYN mice display loss of adiposity, altered feeding behavior, decreased EE, as well as deregulation of peripheral hormones and hypothalamic signaling pathways known to be critically implicated in the regulation of energy homeostasis.

Body Weight and Body Composition of Thy1-aSYN Mice

Thy1-aSYN mice showed a decreased body weight observable from 3 months of age compared to age-matched WT mice, and the difference increased with age. Body composition analysis in 6-month-old animals revealed that Thy1-aSYN mice had lower subcutaneous and visceral fat mass, but no change in lean mass. It has to be noted that Human prospective studies report that PD patients can show decreased body weights several years (2–5 years) before the disease is diagnosed (Durrieu et al., 1992; Chen et al., 2003; Cheshire and Wszolek, 2005; Sharma and Lewis, 2017), after which their average body weights decline. Anthropometric studies show that this weight loss is essentially associated with reduced body fat mass, but not with muscle loss (Markus et al., 1993; Beyers et al., 1995;

Lorefalt et al., 2004, 2009). Therefore, the phenotype of the Thy1-aSYN mouse model recapitulates several features reported in PD patients. Because PD patients are at higher risk of reduced bone mineral density and fractures (Torsney et al., 2014), we aimed to measure bone mineral density in the Thy1-aSYN and WT mice, showing no difference between genotypes.

Altered Feeding Behavior and Energy Metabolism

When individually housed in metabolic cages, 6-month-old transgenic mice showed a decrease in food consumption compared to control mice. This was associated with an altered meal pattern resulting in a smaller meal size. Decreased food consumption and altered meal pattern could arise from a number of factors observed in this transgenic mouse model. First, Thy1-aSYN mice exhibit early and sustained olfactory detection and discrimination deficits without total loss of olfaction, as it is usually reported in patients (Fleming et al., 2008). Olfaction influences food intake (Soria-Gomez et al., 2014) and therefore, such olfactory deficiencies might contribute to a lower food consumption of Thy1-aSYN mice. Second, Thy1-aSYN mice exhibit increased anxiety, that is frequently experienced by PD patients (Mouren et al., 1983). Various studies have associated stress and anxiety to alteration in food intake and body weight (Rivest et al., 1989; Dunn and Berridge, 1990) and this could impact the feeding behavior in our study. Third, Thy1-aSYN mice show reductions in fecal pellet output when exposed to a novelty stress from 2.5–3 months of age, as well as alpha-synuclein accumulation in the colonic myenteric ganglia as reported in 7–8-month-old animals (Wang et al., 2012). Such gastrointestinal alterations could contribute to weight loss in transgenic animals both by altering their food intake behavior and by causing malabsorption. Thy1-aSYN mice displayed a decreased EE compared to controls, thus arguing against the possibility that an EE dysregulation could contribute to weight loss in our model. Our observations are consistent with the report that weight loss in PD occurs regardless to changes in daily EE (Delikanaki-Skaribas et al., 2009). Analyses of oxygen consumption and RER analyses did not evidence significant changes between transgenic and WT mice. However, they revealed that EE, oxygen consumption and RER were significantly decreased during the light cycle compared to the dark cycle in WT animals but no such differences were observed in Thy1-aSYN mice. This suggests that Thy1-aSYN mice could display alterations in temporal rhythms in energy metabolism and this could be linked to deficits in circadian-regulated behavior (Kudo et al., 2011).

Hyperactivity, Dopamine, and Face-Validity of the Thy1-aSYN Model

Behavioral characterization of 6-month-old transgenic mice showed an increased activity for both horizontal and vertical movements, in line with previous reports of increased open-field activity of Thy1-aSYN mice at 7 months (Lam et al., 2011). Increased activity of Thy1-aSYN mice has to be considered

along with the increased extracellular striatal dopamine reported in the Thy1-aSYN mice at 6 months of age and should be distinguished of the later decreased locomotion observed in 14-month-old Thy1-aSYN mice, when striatal dopamine is significantly lost (Lam et al., 2011; Chesselet et al., 2012). Interestingly, an increased activity has also been reported for other mouse models of PD. For instance, knock-in mice bearing the G2019S LRRK2 mutation (a frequent cause of familial PD) have a hyperactive phenotype in the open field test (Longo et al., 2014). Similarly, MitoPark mice (in which the mitochondrial transcription factor Tfam is selectively removed in midbrain dopamine neurons) display at 6 weeks higher activity scores at both horizontal and vertical movements than control mice, while this hyperactivity is reversed to bradykinesia at 12 weeks of age, when dopamine levels get significantly lower in their striatum (Galter et al., 2010). Although it is difficult to extrapolate these data to patients in which levodopa-responsive motor symptoms support the diagnosis, one could hypothesize that early deregulation of dopamine could contribute to presymptomatic motor changes, as suggested in healthy carriers of the LRRK2 G2019S mutation (Mirelman et al., 2011). Noteworthy, the nigrostriatal dopaminergic pathway has also been implicated in feeding (Ungerstedt, 1971; Szczypka et al., 2001) and an excess of dopamine signaling has been reported to inhibit feeding in mice, as demonstrated with non-specific dopamine receptor agonists, DAT inhibitors, or amphetamines (Leibowitz, 1975). As such, changes in dopamine concentration could contribute to hyperactivity, impairments in challenging motor test and feeding abnormalities in 6-month-old Thy1-aSYN mice.

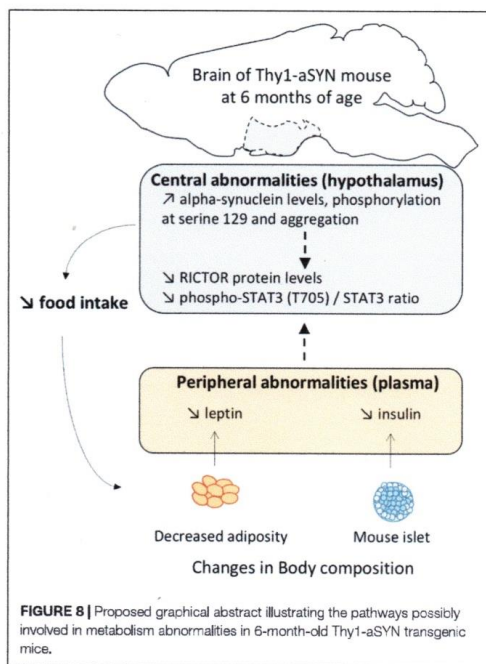
Deregulation in Hormones Controlling Energy Homeostasis

Research on the mechanisms governing body weight, feeding behavior and energy metabolism has provided insight into complex interactions between peripheral signals and the central nervous system (Schwartz et al., 2000). Both plasma insulin and leptin concentrations are decreased in 6-month-old Thy1-aSYN mice. The leptin hormone is produced by white adipose tissue (Considine et al., 1996). Its level declines in Humans and mice after weight loss and accordingly a lower plasma leptin concentration was reported in PD patients with weight loss (Lorefalt et al., 2009; Fiszler et al., 2010). Hypoleptinemia has also been reported in transgenic mice overexpressing A53T alpha-synuclein (Rothman et al., 2014), as well as in mice overexpressing amyloid precursor protein (Ishii et al., 2014) and in two Huntington's disease mouse models (Phan et al., 2009) and might therefore appear as a feature frequently associated with pathological protein accumulation in mice. Insulin is secreted from pancreatic beta cells and its circulating concentrations show a positive correlation with body fat mass (Yu and Kim, 2012). This suggests that the declines in leptin and insulin levels are consequences of the changes in body composition in the Thy1-aSYN mice. In turn, the deregulation of these hormones could alter the phenotype of Thy1-aSYN mice in several ways. For instance, insulin increases adiposity, promotes

lipid synthesis, and inhibits lipolysis (Baskin et al., 1999). Also, both leptin and insulin were shown to raise EE when administered to rodents (Menendez and Atrens, 1989; Morton et al., 2011), therefore directly linking decline in these hormones and reduction in EE in the Thy1-aSYN mice. Insulin and leptin have also neuroprotective properties and can influence synaptic plasticity. Among other studies, leptin administration rescued dopaminergic neurons, decreased the apomorphine-induced rotational behavior and restored striatal catecholamine levels in the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of dopaminergic cell death (Weng et al., 2007). Also, insulin induces the expression of the activity-regulated cytoskeleton-associated gene (Chen et al., 2014), an effector immediate early gene critical to protein-synthesis synaptic plasticity (Rosi, 2011). Leptin receptors and insulin receptors are expressed by dopaminergic neurons in midbrain (Figlewicz et al., 2003) and both hormones act directly on these neurons (Ijzerman et al., 2006; Mebel et al., 2012). Leptin has been shown to modulate dopamine D2 receptor expression in striatum (Pfaffly et al., 2010). Insulin has been shown to depress dopamine concentration in the ventral tegmental area via increasing its reuptake through dopamine transporter (Mebel et al., 2012). Although these results indicate a potential role of leptin and insulin in regulating the action of dopamine in the brain, the exact molecular mechanisms of such actions are yet to be elucidated.

Alpha-Synuclein and Deregulation of Signaling Pathways Regulating Energy Metabolism in the Hypothalamus of Thy1-aSYN Mice

It is now well established that the brain, especially the hypothalamus, maintains body weight homeostasis by effectively adjusting food intake and EE in response to changes in levels of various nutritional status indicators. In PD, alpha-synuclein pathology may spread along neuronal pathways and neuropathological hypothalamic involvement was previously reported (Langston and Forno, 1978; Ansorge et al., 1997), even at preclinical stages (De Pablo-Fernandez et al., 2017). Here, we report for the first time that alpha-synuclein accumulates in the hypothalamus of Thy1-aSYN mice, to levels comparable to those of the *substantia nigra* and the striatum. We also show increased levels of alpha-synuclein phosphorylation at serine 129 and alpha-synuclein aggregation in this brain region. Alpha-synuclein has been suggested to fulfill roles in synaptic function and plasticity and thus it is possible that the alpha-synuclein pathology in the hypothalamus causes functional alterations leading to metabolism abnormalities. Importantly, alpha-synuclein level was also elevated in the plasma of Thy1-aSYN mice compared to WT mice. Although it is not clear how plasma alpha-synuclein levels relate to abnormal aggregated alpha-synuclein in the brain, our results confer to the Thy1-aSYN mouse model a major interest to evaluate the blood as a source of neurodegeneration biomarkers. By further analyzing the receptors and protein complexes known to be critically implicated in the regulation of metabolism, we evidenced a decreased phosphorylation at tyrosine 705 of the transcription factor STAT3 in the hypothalamus already present in 3-month-old Thy1-aSYN mice. STAT3 phosphorylation at tyrosine 705 promotes its homodimerization or heterodimerization with other STATs which leads to nucleus translocation and DNA binding. *In vivo* studies have provided evidence indicating that STAT3 activation in the hypothalamus is critical to the regulation of food intake and energy balance, particularly in the functioning of leptin (Bates et al., 2003; Buettner et al., 2006). Thus the downregulation of STAT3 phosphorylation could sign defects in the hypothalamus function in Thy1-aSYN mice. Over the last decade, mTOR complexes 1 and 2 (mTORC1 and mTORC2) have also emerged as critical cellular energy sensors because of their ability to couple hormones (including leptin and insulin) and nutrient signals with the regulation of energy balance and metabolism and activity among others (Haissaguerre et al., 2014). We compared the expression of major mTOR proteins and showed alterations of the protein levels of rictor, a required subunit for mTORC2, with increased protein levels in 3-month-old Thy1-aSYN mice, and decrease protein levels at 6 months of age. We did not observe changes in rictor levels in the *substantia nigra* of 6-month-old Thy1-aSYN (data not shown), suggesting that alpha-synuclein overexpression causes brain region-specific deregulations in our model. Although the function of mTORC2 is not as well-known as the function of mTORC1, it regulates actin polarization and endocytosis (Rispoli et al., 2015) and sphingolipid biosynthesis (Roelants et al., 2011). It appears



important to further evaluate the role of mTORC2 in these pathways that we and others reported as notably deregulated in PD (Mutez et al., 2014; Dijkstra et al., 2015). Thus, considering the pivotal roles of the hypothalamus in regulating feeding behavior and energy metabolism, it is reasonable to speculate that the STAT3/mTORC2 alterations could contribute to the metabolic phenotype of Thy1-aSYN mice (Figure 8).

CONCLUSION

In conclusion, our data demonstrate a link between alpha-synuclein overexpression and metabolic abnormalities including decreased body weight and adiposity, altered feeding behavior and decreased EE together with hypoleptinemia and hypoinsulinemia in the Thy1-aSYN mouse model. They moreover raise the possibility that alterations of the STAT3/mTORC2 signaling pathways in the hypothalamus of Thy1-aSYN transgenic mice could contribute to the disruption of their feeding behavior and energy metabolism. This emphasizes the need to better characterize the hypothalamus molecular dysregulation in PD to understand the etiology of unintended body weight change in this disease. Future studies are particularly needed to evaluate the interest of the proteins linked to STAT3 and mTORC2 signaling as biomarkers for PD and to test whether strategies aimed to normalize energy metabolism would interfere with alpha-synuclein-linked pathology.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ECu, MM, CL, WS and ASi contributed to the research project execution and to the data and statistical analyses. CV-M, OV, and ECu contributed to the project conception and to the manuscript reviewing. ASi, ASa, KS, TC, PS, M-AB, HC

helped with the project execution. ECa supervised the use of the metabolic cages. AL helped with the meal pattern analysis. EM, AD, and BG revised the manuscript providing expertise in PD and cell signaling. M-CC-H contributed to the project conception and organization and edited the manuscript providing expertise in molecular neurodegeneration in PD. KB contributed to the project conception, organization and execution, to the statistical analyses and predominantly contributed to the writing of the article. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by INSERM, Région Hauts-de-France, University of Lille (projet PEPS), CNRS, Dementia in Neurological and Mental Diseases (DN2M) and the CHRU de Lille. KB received a postdoctoral fellowship from Lundbeck laboratories. ECu received a research fellowship from Agence Régionale de Santé Hauts-de-France. ASi received a doctoral scholarship from the Doctoral School "Biology and Health" of Lille (446).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Eliezer Masliah, Dr. Marie-Françoise Chesselet and Dr. Amandeep Mann for giving access to the Thy1-aSYN transgenic mice and their helpful assistance with this model. We thank Romain Dehaynin and Delphine Taillieu for transgenic mouse production and animal care. We also thank Christine Bourgois for great administrative support and Jean-Marc Taymans for helpful discussion.

REFERENCES

- Aiello, M., Eleopra, R., Foroni, F., Rinaldo, S., and Rumiati, R. I. (2017). Weight gain after STN-DBS: the role of reward sensitivity and impulsivity. *Cortex* 92, 150–161. doi: 10.1016/j.cortex.2017.04.005
- Ansorge, O., Daniel, S. E., and Pearce, R. K. (1997). Neuronal loss and plasticity in the supraoptic nucleus in Parkinson's disease. *Neurology* 49, 610–613. doi: 10.1212/WNL.49.2.610
- Bannier, S., Montaurier, C., Derost, P. P., Ulla, M., Lemaire, J. J., Boirie, Y., et al. (2009). Overweight after deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease: long term follow-up. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80, 484–488. doi: 10.1136/jnnp.2008.158576
- Baskin, D. G., Figlewicz, L., Lattemann, D., Seeley, R. J., Woods, S. C., Porte, D. Jr, and Schwartz, M. W. (1999). Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res.* 848, 114–123. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01974-5
- Bates, S. H., Stearns, W. H., Dundon, T. A., Schubert, M., Tso, A. W., Wang, Y., et al. (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421, 856–859. doi: 10.1038/nature01388
- Beyer, P. L., Palarino, M. Y., Michalek, D., Busenbark, K., and Koller, W. C. (1995). Weight change and body composition in patients with Parkinson's disease. *J. Am. Diet. Assoc.* 95, 979–983. doi: 10.1016/S0002-8223(95)00269-3
- Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., et al. (2001). Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21, 6853–6861. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-17-06853.2001
- Bridi, J. C., and Hirth, F. (2018). Mechanisms of alpha-synuclein induced synaptopathy in Parkinson's Disease. *Front. Neurosci.* 12:80. doi: 10.3389/fnins.2018.00080
- Buettner, C., Poci, A., Muse, E. D., Etgen, A. M., Myers, MG Jr, and Rossetti, L. (2006). Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab.* 4, 49–60. doi: 10.1016/j.cmet.2006.04.014
- Butler, A. A., and Kozak, L. P. (2010). A recurring problem with the analysis of energy expenditure in genetic models expressing lean and obese phenotypes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 59, 323–329. doi: 10.2337/dm.2009-1471
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., et al. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1167–1169. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17103-1
- Chen, H., Zhang, S. M., Herman, M. A., Willett, W. C., and Ascherio, A. (2003). Weight loss in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53, 676–679. doi: 10.1002/ana.10577
- Chen, T. J., Wang, D. C., Hung, H. S., and Ho, H. F. (2014). Insulin can induce the expression of a memory-related synaptic protein through facilitating AMPA receptor endocytosis in rat cortical neurons. *Cell Mol. Life Sci.* 71, 4069–4080. doi: 10.1007/s00018-014-1620-5

- Cheshire, W. P. Jr., and Wszolek, Z. K. (2005). Body mass index is reduced early in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 11, 35–38. doi: 10.1016/j.parkreldis.2004.07.001
- Chesselet, M. F., and Richter, F. (2011). Modelling of Parkinson's disease in mice. *Lancet Neurol.* 10, 1108–1118. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70227-7
- Chesselet, M. F., Richter, F., Zhu, C., Magen, I., Watson, M. B., and Subramaniam, S. R. (2012). A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn ("Line 61") mice. *Neurotherapeutics* 9, 297–314. doi: 10.1007/s13311-012-0104-2
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriaucunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334, 292–295. doi: 10.1056/NEJM199602013340503
- Cumming, K., Macleod, A. D., Myint, P. K., and Counsell, C. E. (2017). Early weight loss in parkinsonism predicts poor outcomes: evidence from an incident cohort study. *Neurology* 89, 2254–2261. doi: 10.1212/WNL.0000000000004691
- De Pablo-Fernandez, E., Courtney, R., Holton, J. L., and Warner, T. T. (2017). Hypothalamic alpha-synuclein and its relation to weight loss and autonomic symptoms in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 32, 296–298. doi: 10.1002/mds.26868
- Delikanaki-Skaribas, E., Trail, M., Wong, W. W., and Lai, E. C. (2009). Daily energy expenditure, physical activity, and weight loss in Parkinson's disease patients. *Mov. Disord.* 24, 667–671. doi: 10.1002/mds.22372
- Dijkstra, A. A., Ingrassia, A., de Menezes, R. X., van Kesteren, R. E., Rozenmuller, A. J., Heutink, P., et al. (2015). Evidence for immune response, axonal dysfunction and reduced endocytosis in the substantia nigra in early stage parkinson's disease. *PLoS One* 10:e0128651. doi: 10.1371/journal.pone.0128651
- Dunn, A. J., and Berridge, C. W. (1990). Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 15, 71–100. doi: 10.1016/0165-0173(90)90012-D
- Durrieu, G., Me, L. L., Rascol, O., Senard, J. M., Rascol, A., and Montastruc, J. L. (1992). Parkinson's disease and weight loss: a study with anthropometric and nutritional assessment. *Clin. Auton. Res.* 2, 153–157. doi: 10.1007/BF01818955
- Fereshtehnejad, S. M., Ghazi, L., Sadeghi, M., Khaefpanah, D., Shahidi, G. A., Delbari, A., et al. (2014). Prevalence of malnutrition in patients with Parkinson's disease: a comparative study with healthy controls using Mini Nutritional Assessment (MNA) questionnaire. *J. Parkinsons Dis.* 4, 473–481. doi: 10.3233/JPD-130323
- Figlewicz, D. P., Evans, S. B., Murphy, J., Hoen, M., and Baskin, D. G. (2003). Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res.* 964, 107–115. doi: 10.1016/S0006-8993(02)04087-8
- Fischer, U., Michalowska, M., Baranowska, B., Wolinska-Witort, E., Jeske, W., Jethon, M., et al. (2010). Leptin and ghrelin concentrations and weight loss in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 121, 230–236. doi: 10.1111/j.1600-0404.2009.01185.x
- Fleming, S. M., Ekhtor, O. R., and Ghisays, V. (2013). Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *J. Vis. Exp.* 76:e50303. doi: 10.3791/50303
- Fleming, S. M., Salcedo, J., Fernagut, P. O., Rockenstein, E., Masliah, E., Levine, M. S., et al. (2004). Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 24, 9434–9440. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3080-04.2004
- Fleming, S. M., Tetreault, N. A., Mulligan, C. K., Hutson, C. B., Masliah, E., and Chesselet, M. F. (2008). Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Eur. J. Neurosci.* 28, 247–256. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06346.x
- Galter, D., Pernold, K., Yoshitake, T., Lindqvist, E., Hoffer, B., Kehr, J., et al. (2010). MitoPark mice mirror the slow progression of key symptoms and L-DOPA response in Parkinson's disease. *Genes Brain Behav.* 9, 173–181. doi: 10.1111/j.1601-183X.2009.00542.x
- Haissaguerre, M., Sautisse, N., and Cota, D. (2014). Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 397, 67–77. doi: 10.1016/j.mce.2014.07.015
- Hassouna, R., Iabbarhe, A., Zizzari, P., Videau, C., Culler, M., Epelbaum, J., et al. (2013). Actions of agonists and antagonists of the ghrelin/GHS-R pathway on GH secretion, appetite, and cFos activity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4:25. doi: 10.3389/fendo.2013.00025
- Hommel, J. D., Trinko, R., Sears, R. M., Georgescu, D., Liu, Z. W., Gao, X. B., et al. (2006). Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron* 51, 801–810. doi: 10.1016/j.neuron.2006.08.023
- Ibanez, P., Bonnet, A. M., DeBarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., et al. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1169–1171. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17104-3
- Ishii, M., Wang, G., Racchumi, G., Dyke, J. P., and Iadecola, C. (2014). Transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein exhibit early metabolic deficits and a pathologically low leptin state associated with hypothalamic dysfunction in arcuate neuroepitope Y neurons. *J. Neurosci.* 34, 9096–9106. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0872-14.2014
- Jorgensen, H. U., Werdelin, L., Lokkegaard, A., Westerber, K. R., and Simonsen, L. (2012). Free-living energy expenditure reduced after deep brain stimulation surgery for Parkinson's disease. *Clin. Physiol. Imaging* 32, 214–220. doi: 10.1111/j.1475-097X.2011.01079.x
- Kaiyala, K. J., Morton, G. J., Leroux, B. G., Ogiimoto, K., Wisse, B., and Schwartz, M. W. (2010). Identification of body fat mass as a major determinant of metabolic rate in mice. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 59, 1657–1666. doi: 10.2337/db09-1582
- Kudo, T., Loh, D. II., Truong, D., Wu, Y., and Colwell, C. S. (2011). Circadian dysfunction in a mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 232, 66–75. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.08.003
- Lam, H. A., Wu, N., Cely, I., Kelly, R. L., Hean, S., Richter, F., et al. (2011). Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 89, 1091–1102. doi: 10.1002/jnr.22611
- Langston, J. W., and Forno, L. S. (1978). The hypothalamus in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 3, 129–133. doi: 10.1002/ana.410030207
- Leibowitz, S. F. (1975). Amphetamine: possible site and mode of action for producing anorexia in the rat. *Brain Res.* 84, 160–167. doi: 10.1016/0006-8993(75)90811-2
- Longo, F., Russo, I., Shimshek, D. R., Greggio, E., and Morari, M. (2014). Genetic and pharmacological evidence that G2019S LRRK2 confers a hyperkinetic phenotype, resistant to motor decline associated with aging. *Neurobiol. Dis.* 71, 62–73. doi: 10.1016/j.nbd.2014.07.013
- Lorefalt, B., Ganowiak, W., Palhagen, S., Toss, G., Unosson, M., and Granerus, A. K. (2004). Factors of importance for weight loss in elderly patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 110, 180–187. doi: 10.1111/j.1600-0404.2004.00307.x
- Lorefalt, B., Toss, G., and Granerus, A. K. (2009). Weight loss, body fat mass, and leptin in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 24, 885–890. doi: 10.1002/mds.22466
- Ma, K., Xiong, N., Shen, Y., Han, C., Liu, L., Zhang, G., et al. (2018). Weight loss and malnutrition in patients with parkinson's disease: current knowledge and future prospects. *Front. Aging Neurosci.* 10:1. doi: 10.3389/fnagi.2018.00001
- Maraganore, D. M., de Andrade, M., Elbaz, A., Farrer, M. J., Ioannidis, J. P., Kruger, R., et al. (2006). Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 296, 661–670. doi: 10.1001/jama.296.6.661
- Markus, H. S., Cox, M., and Tomkins, A. M. (1992). Raised resting energy expenditure in Parkinson's disease and its relationship to muscle rigidity. *Clin. Sci. (Lond.)* 83, 199–204. doi: 10.1042/cs0830199
- Markus, H. S., Tomkins, A. M., and Stern, G. M. (1993). Increased prevalence of undernutrition in Parkinson's disease and its relationship to clinical disease parameters. *J. Neural Transm. Park Dis. Dement Sect.* 5, 117–125. doi: 10.1007/BF02251202
- Mebel, D. M., Wong, J. C., Dong, Y. J., and Borgland, S. L. (2012). Insulin in the ventral tegmental area reduces hedonic feeding and suppresses dopamine concentration via increased reuptake. *Eur. J. Neurosci.* 36, 2336–2346. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08168.x
- Menendez, J. A., and Atrens, D. M. (1989). Insulin increases energy expenditure and respiratory quotient in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34, 765–768. doi: 10.1016/0091-3057(89)90272-4
- Mequinion, M., Caron, E., Zgheib, S., Stievenard, A., Zizzari, P., Tolle, V., et al. (2015). Physical activity: benefit or weakness in metabolic adaptations in a

- mouse model of chronic food restriction? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308, E241–E255. doi: 10.1152/ajpendo.00340.2014
- Mirelman, A., Gurevich, T., Giladi, N., Bar-Shira, A., Orr-Urtreger, A., and Hausdorff, J. M. (2011). Gait alterations in healthy carriers of the LRRK2 G2019S mutation. *Ann. Neurol.* 69, 193–197. doi: 10.1002/ana.22165
- Morton, G. J., Kaiyala, K. J., Fisher, J. D., Ogimoto, K., Schwartz, M. W., and Wisse, B. E. (2011). Identification of a physiological role for leptin in the regulation of ambulatory activity and wheel running in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300, E392–E401. doi: 10.1152/ajpendo.00546.2010
- Mouren, P., Poinso, Y., Oppenheim, G., Mouren, A., and Nguyen Quang, M. (1983). [Personality of the parkinsonian, clinical and psychometric approach]. *Ann. Med. Psychol. (Paris)* 141, 153–167.
- Mutez, E., Nkiliza, A., Belarbi, K., de Broucker, A., Vanbesien-Mailliot, C., Bleuse, S., et al. (2014). Involvement of the immune system, endocytosis and EIF2 signaling in both genetically determined and sporadic forms of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 63, 165–170. doi: 10.1016/j.nbd.2013.11.007
- Pak, K., Shin, H. K., Kim, E. J., Lee, J. H., Lyoo, C. H., Son, J., et al. (2018). Weight loss is associated with rapid striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 51, 67–72. doi: 10.1016/j.parkreldis.2018.02.044
- Pfaffly, J., Michalides, M., Wang, G. J., Pessin, J. E., Volkow, N. D., and Thanos, P. K. (2010). Leptin increases striatal dopamine D2 receptor binding in leptin-deficient obese (ob/ob) mice. *Synapse* 64, 503–510. doi: 10.1002/syn.20755
- Phan, J., Hickey, M. A., Zhang, P., Chesselet, M. F., and Reue, K. (2009). Adipose tissue dysfunction tracks disease progression in two Huntington's disease mouse models. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1006–1016. doi: 10.1093/hmg/ddn428
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047. doi: 10.1126/science.276.5321.2045
- Rispol, D., Eltschinger, S., Stahl, M., Vaga, S., Bodenmiller, B., Abraham, Y., et al. (2015). Target of rapamycin complex 2 regulates actin polarization and endocytosis via multiple pathways. *J. Biol. Chem.* 290, 14963–14978. doi: 10.1074/jbc.M114.627794
- Rivest, S., Deshaies, Y., and Richard, D. (1989). Effects of corticotropin-releasing factor on energy balance in rats are sex dependent. *Am. J. Physiol.* 257(6 Pt 2), R1417–R1422. doi: 10.1152/ajpregu.1989.257.6.R1417
- Roelants, F. M., Breslow, D. K., Muir, A., Weissman, J. S., and Thorner, J. (2011). Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 19222–19227. doi: 10.1073/pnas.1116.948108
- Rosi, S. (2011). Neuroinflammation and the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Brain Behav. Immun.* 25(Suppl. 1), S39–S49. doi: 10.1016/j.bbi.2011.02.003
- Rothman, S. M., Griffioen, K. J., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Makrogiannis, S., Cong, W. N., et al. (2014). Metabolic abnormalities and hypoleptinemia in alpha-synuclein A53T mutant mice. *Neurobiol. Aging* 35, 1153–1161. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.088
- Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., and Jenner, P. (2017). Non-motor features of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 435–450. doi: 10.1038/nrn.2017.62
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D. Jr., Seeley, R. J., and Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661–671. doi: 10.1038/35007534
- Sharma, J. C., and Lewis, A. (2017). Weight in Parkinson's disease: phenotypical significance. *Int. Rev. Neurobiol.* 134, 891–919. doi: 10.1016/bs.irn.2017.04.011
- Sharma, J. C., and Vassallo, M. (2014). Prognostic significance of weight changes in Parkinson's disease: the Park-weight phenotype. *Neurodegener. Dis. Manag.* 4, 309–316. doi: 10.2217/nmt.14.25
- Simon-Sanchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., et al. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 41, 1308–1312. doi: 10.1038/ng.487
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., et al. (2003). Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841. doi: 10.1126/science.1090278302/5646/841
- Soria-Gomez, E., Bellocchio, L., Reguero, L., Lepousez, G., Martin, C., Bendahmane, M., et al. (2014). The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nat. Neurosci.* 17, 407–415. doi: 10.1038/nn.3647
- Szczypka, M. S., Kwok, K., Brot, M. D., Marck, B. T., Matsumoto, A. M., Donahue, B. A., et al. (2001). Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 30, 819–828. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00319-1
- Torsney, K. M., Noyce, A. J., Doherty, K. M., Bestwick, J. P., Dobson, R., and Lees, A. J. (2014). Bone health in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85, 1159–1166. doi: 10.1136/jnnp-2013-307307
- Uc, E. Y., Struck, L. K., Rodnitzky, R. L., Zimmerman, B., Dobson, J., and Evans, W. J. (2006). Predictors of weight loss in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 21, 930–936. doi: 10.1002/mds.20837
- Ungerstedt, U. (1971). Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 367, 95–122. doi: 10.1111/j.1365-201X.1971.tb11001.x
- van der Marck, M. A., Dicke, H. C., Uc, E. Y., Kentin, Z. H., Borm, G. F., Bloem, B. R., et al. (2012). Body mass index in Parkinson's disease: a meta-analysis. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, 263–267. doi: 10.1016/j.parkreldis.2011.10.016
- Wang, L., Magen, I., Yuan, P. Q., Subramaniam, S. R., Richter, F., Chesselet, M. F., et al. (2012). Mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein display alterations in colonic myenteric ganglia and defecation. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, e425–e436. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01974.x
- Weng, Z., Signore, A. P., Gao, Y., Wang, S., Zhang, F., Hastings, T., et al. (2007). Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 34479–34491. doi: 10.1074/jbc.M705426200
- Yu, J. H., and Kim, M. S. (2012). Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab. J.* 36, 391–398. doi: 10.4093/dmj.2012.36.6.391

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Cuvelier, Méquinion, Leghay, Sibran, Stevenard, Sarchione, Bonte, Vanbesien-Mailliot, Viltart, Saitoski, Caron, Labarthe, Comptaer, Semaille, Carrié, Mutez, Gressier, Destée, Chartier-Harlin and Belarbi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Caractérisation métabolique et modulation pharmacologique de l'activité glucocérebrosidase dans un modèle murin surexprimant l' α -synucléine.

La maladie de Parkinson (MP) est la pathologie motrice neurodégénérative progressive la plus fréquente. Elle est caractérisée par une neurodégénérescence dopaminergique dans la substance noire, une accumulation neuronale d' α -synucléine et une neuroinflammation chronique. Les symptômes moteurs caractéristiques sont précédés de troubles non moteurs parmi lesquels un trouble olfactif et une perte de poids. Un dérèglement du métabolisme lipidique pourrait être impliqué dans la MP. En effet, des variations de poids et une perte d'adiposité ont été constatées dans les stades précoces de la MP. De plus, la perte de fonction liée aux mutations du gène GBA1 codant la glucocérebrosidase (GBA) lysosomale, une enzyme régulant le métabolisme des sphingolipides, est un facteur de risque majeur de développer la MP.

L'objectif principal était de caractériser le phénotype non moteur, métabolique et la réponse immunitaire des souris Thy1-aSYN surexprimant l' α -synucléine humaine au niveau neuronal. Puis, le lien entre l'activité GBA, les fonctions sensorimotrices, l'accumulation de l' α -synucléine et la neuroinflammation chez les souris sauvages (WT) et Thy1-aSYN était étudié.

Les souris Thy1-aSYN et WT ont été évaluées à l'âge de 3, 6 et 12 mois sur leurs performances olfactives, motrices et métaboliques (gain de poids, composition corporelle, métabolisme énergétique). Dans le sang, le glucose, la leptine et l'insuline ont été dosées. Et dans l'hypothalamus, le taux d' α -synucléine, son agrégation, et des marqueurs de la voie de signalisation mTOR ont été analysés. Les cellules du système immunitaire ont été quantifiées par cytométrie en flux. Puis, des souris mâles Thy1-aSYN et WT âgées de 6 mois ont été traitées par voie intrapéritonéale pendant 14 jours par le conduritol-beta-époxyde (inhibiteur de GBA, 100mg/kg/j), le miglustat (activateur de GBA, 100mg/kg/j), ou le tampon phosphate salin. L'activité cérébrale GBA a été dosée par essai fluorométrique. Les performances sensorimotrices ont été évaluées à l'aide du test de challenge de la poutre et du retrait de l'adhésif. Le taux d' α -synucléine et son agrégation ont été quantifiés ainsi que les populations du système immunitaire.

Les souris Thy1-aSYN ont des troubles olfactifs et de motricité fine dès l'âge de 3 mois. Elles prennent moins de poids que les souris WT tout au long de leur vie. Leur composition corporelle à l'âge de 6 mois montre que cette perte de poids est liée à une diminution de la masse grasse sous-cutanée et viscérale. De plus, les souris Thy1-aSYN consomment moins d'eau et de nourriture, ont une activité plus importante et une énergie libérée moindre. Ces troubles métaboliques sont liés à une diminution de la leptinémie, de l'insulinémie, et à une agrégation d' α -synucléine associée à une diminution de Rictor et de l'activation de STAT3 dans l'hypothalamus, connus pour réguler l'homéostasie énergétique. L'analyse des cellules immunitaires suggère que les souris Thy1-aSYN âgés de 3 mois ont moins de lymphocytes T CD8+ dans le sang. Dans le second temps, le traitement par conduritol-beta-époxyde et miglustat diminue et augmente respectivement l'activité cérébrale de GBA. L'inhibition de l'activité GBA promeut l'apparition de troubles neurosensoriels et une augmentation cérébrale des leucocytes chez les souris Thy1-aSYN. Aucun changement majeur de l'agrégation de l' α -synucléine suivant la modulation de l'activité glucocérebrosidase n'a été observé chez les souris Thy1-aSYN et WT.

En conclusion, les troubles métaboliques sont liés à la surexpression d' α -synucléine, qui altère la voie de signalisation de mTOR et STAT3 dans l'hypothalamus et pourrait ainsi perturber l'homéostasie énergétique des souris Thy1-aSYN. Les troubles observés chez ces souris traitées par un inhibiteur de GBA suggèrent un effet synergique entre la perte de fonction de GBA et l'accumulation de l' α -synucléine, qui pourrait contribuer aux troubles sensorimoteurs et à la neuroinflammation dans la MP.

Mots clés : α -synucléine, métabolisme énergétique, leptine, glucocérebrosidase, inflammation, maladie de Parkinson

Metabolic phenotype and pharmacological modulation of glucocerebrosidase activity in a transgenic mouse model overexpressing α -synuclein.

Parkinson's disease (PD) is the most common movement neurodegenerative disorder. It is characterized by the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra, by a pathological accumulation of α -synuclein in neurons and by a chronic neuroinflammation. Characteristic motor symptoms can be preceded by non-motor dysfunctions including olfaction deficits and body weight loss. Increasing evidences suggest that deregulation in lipid metabolism could be involved in PD. Indeed, unintended body weight change and loss of adiposity has been documented in early stages PD patients. Moreover, loss-of-function mutations in the GBA1 gene encoding lysosomal glucocerebrosidase (GBA), an enzyme regulating the metabolism of sphingolipids, are common risk factors for PD.

The aim of this project is first to characterize the non-motor, metabolic and immune response phenotype of Thy1-aSYN transgenic mice overexpressing human α -synuclein in neurons, and second to better understand the links between glucocerebrosidase activity and sensorimotor functions, α -synuclein accumulation and neuroinflammation in wild-type (WT) and Thy1-aSYN mice.

Thy1-aSYN and WT mice were evaluated from 3, 6 and 12 months of age for olfactory and motor performances and metabolism (weight gain over aging, body composition, energy metabolism). Blood glucose, insulin and leptin levels were quantified as well as α -synuclein levels and aggregation and markers of the mTOR signaling pathway in the hypothalamus. Immune cell populations were numbered by multicolor flow cytometry. In a second study, 6-month-old male mice were treated for 14 days by intraperitoneal injection of conduritol-beta-époxyde (an inhibitor of lysosomal GBA; 100mg/kg/day), miglustat (an enhancer of lysosomal GBA activity; 100mg/kg/day) or phosphate buffered saline. Brain GBA activity was determined by fluorogenic assay. Sensorimotor performances were evaluated in the challenging beam test and the removal adhesive test. α -synuclein levels and aggregation as well as immune cell populations were measured.

Our results show that Thy1-aSYN mice have olfactory and fine motor impairments from 3 months of age. Thy1-aSYN mice gain less body weight throughout life than WT mice. Body composition analysis of 6-month-old animals evidenced that body mass loss is due to reduced subcutaneous and visceral fat mass. Thy1-aSYN mice moreover show lower food and water consumption, increased spontaneous activity and a reduced energy expenditure. These metabolic disorders are associated with decreased insulin and leptin levels in the blood and in the hypothalamus with α -synuclein aggregation and decreased levels of Rictor and of the activated form of STAT3 both known to regulate energy homeostasis. Numeration of immune cells suggest that 3-month-old Thy1-aSYN mice have less CD8+ T lymphocytes than WT mice in the blood. In the second study, conduritol-beta-époxyde and miglustat decreased and increased lysosomal brain GBA activity, respectively. GBA inhibition promoted the onset of neuromotor deficits and increased the number of brain CD45+ cells in Thy1-aSYN mice. No striking changes in α -synuclein aggregation were observed in Thy1-aSYN mice or WT mice.

Together, our results show that metabolic alterations are an important phenotype of α -synuclein overexpression and that impaired STAT3 and mTORC2 signaling in the hypothalamus may underlie the disruption of energy metabolism in Thy1-aSYN mice. Abnormalities observed in Thy1-aSYN treated by an inhibitor of GBA suggest a synergistic effect between GBA loss of function and α -synuclein accumulation that could contribute to sensorimotor deficits and neuroinflammation in PD.

Keywords : α -synuclein, energy metabolism, leptin, glucocerebrosidase, inflammation, Parkinson disease

Intitulé et adresse du laboratoire : UMRS-1172 Equipe « stades précoces de la maladie de Parkinson », 1 place de Verdun, 59006 Lille, France