HAL
open science

Impact moléculaire de l'exposition subchronique par voie orale à un pesticide, le paraquat, dans un modèle murin transgénique de synucléinopathie humaine : implication du système nerveux entérique

Nicolas Naudet

▶ **To cite this version:**

Nicolas Naudet. Impact moléculaire de l'exposition subchronique par voie orale à un pesticide, le paraquat, dans un modèle murin transgénique de synucléinopathie humaine : implication du système nerveux entérique. Autre [q-bio.OT]. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1280 . tel-01768310

HAL Id: tel-01768310

https://theses.hal.science/tel-01768310

Submitted on 17 Apr 2018

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

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

N°d'ordre NNT : xxx

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

ED 205

École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 20 décembre 2017 à 14h, par :

NAUDET Nicolas

Impact moléculaire de l'exposition subchronique par voie orale à un pesticide, le paraquat, dans un modèle murin transgénique de synucléinopathie humaine. Implication du système nerveux entérique.

Devant le jury composé de :

Pr. ZIMMER Luc PUPH CRNL CERMEP HCL Université Claude Bernard Lyon 1
Président du jury
Pr. MESTRE - FRANCES Nadine MCU EPHE Université Montpellier 2
Rapporteur
Dr. GAMET - PAYRASTRE Laurence CR1 TOXALIM INRA UMR 1331
Rapporteur
Pr. DERKINDEREN Pascal PUPH Université de Nantes – Inserm U1235
Rapporteur

Dr. BARON Thierry DR1 ANSES Lyon Directeur de thèse
Dr. BENCSIK Anna DR2 ANSES Lyon Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Financeurs

Mon allocation doctorale de boursier de thèse a été octroyée par le dispositif ARC 3 – Environnement de la région Auvergne Rhône Alpes.

Les fonds utilisés pour mes recherches proviennent du budget de l'unité MND de l'ANSES de Lyon.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers la Région Auvergne Rhône Alpes et l'ANSES, sans lesquels cette thèse n'aurait pas eu de support financier.

La thèse s'est déroulée dans l'unité MND du laboratoire ANSES de Lyon :

ANSES Lyon – Unité MND
31 avenue Tony Garnier
69387 Lyon cedex 03

Remerciements

Je souhaite d'abord remercier chaleureusement les rapporteurs de ma thèse, Madame la Dr. Laurence Gamet-Payrastre, Madame la Pr. Nadine Mestre-Frances et Monsieur le Pr. Pascal Derkinderen, pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer les travaux effectués durant ces trois années.

Je remercie les directeurs successifs du laboratoire ANSES de Lyon, le Dr. Paul Martin, le Dr. Jean-Yves Madec et M. Laurent Lempereur pour m'avoir accueilli dans leurs locaux.

Cette thèse a été pour moi une grande aventure humaine et scientifique avant tout, empreinte de bonheur et de désillusions, durant laquelle j'ai rencontré des personnes remarquables, que je tiens à remercier particulièrement.

Je souhaite remercier au plus haut point le Dr. Thierry Baron, mon directeur de thèse. Cette thèse n'aurait pas été la même sans ton soutien, ta rigueur, ton sérieux et ton humanité. Tu as su canaliser mon éparpillement tout en me laissant la liberté de faire des erreurs. Ces quelques lignes sont bien trop courtes pour t'exprimer à quel point je te suis reconnaissant. Merci.

Je tiens à remercier la Dr. Anna Bencsik, co-directrice de thèse, pour m'avoir appris bien plus que de la science.

Je souhaite remercier la Pr. Emmanuelle Canet-Soulas, directrice de l'école doctorale EDISS, pour m'avoir accompagné tout au long de mon parcours de doctorant.

Je tiens à remercier tous mes collègues de l'unité MND pour tout le bonheur que vous m'avez apporté durant ces trois ans. Merci d'avoir partagé mes doutes, mes joies et mes peines. Merci à toutes les personnes du bureau « paysagé », dans lequel j'ai cohabité avec Jérémy, Dominique C, Dorian, Corinne, Mireille, Claire et Jean Noël. Je remercie aussi ceux qui ne sont pas dans le vacarme du grand bureau à savoir Dominique B, Laïla et Anne-Gaëlle (merci pour tes relectures !). Tous ces moments passés avec vous me manqueront. Au début de ma thèse je pensais être le jeune parmi les anciens, mais j'ai vite appris que l'âge n'est qu'un chiffre sans importance grâce à vous. Je vous remercie surtout pour m'avoir supporté aussi longtemps, ça n'a pas dû être facile.

Je dis un grand merci à Jérémy, qui m'a épaulé dans mes expérimentations. Excuse-moi d'avoir tant chanté lors de nos ELISA et Western Blots, même si nos duos enflammés (sur du Natasha St-Pier), restent et resteront pour moi, des moments inoubliables.

Je remercie aussi du plus profond de mon cœur Corinne, ma Lazizzouille, avec qui j'ai partagé tant de choses. Merci pour ces apéros-pétanques au jus de pomme autour de l'arbre n°31275 du parc de Gerland, merci pour ton sale caractère et merci pour m'avoir écouté.

Je tiens à remercier le Dr. Roger Besançon, maître de stage lorsque j'étais en master. Tu m'as appris une multitude de connaissances et de techniques sans lesquelles je n'aurais pas pu faire ce chemin. Je te porte le plus grand des respects et je te remercie pour ce bel article.

Je remercie également le Dr. Aubin Moutal. Même si tu es outre-Atlantique, en Arizona, on a su garder contact et tu m'as toujours motivé à aller plus loin dans mes recherches. Je m'inspire de ton parcours, merci pour ça.

Je souhaite remercier les établissements m'ayant formé, particulièrement l'Institution Saint Charles de Vienne et l'Université Catholique de Lyon.

Je remercie Sylvie et Teddy, nos amis franco-canadiens qui nous ont fait découvrir leur pays et qui nous envoient tant d'amour outre-Atlantique.

Je remercie Alexandra, on a fêté nos 11 ans d'amitié et tu es toujours là. On partage nos galères, nos joies et nos fous rires. Merci d'être là.

Ces remerciements seraient bien vides si je ne remerciais pas ma famille, et plus particulièrement mes parents. Papa, Maman, merci de me soutenir dans tout ce que j'entreprends. Merci d'être là, merci pour tout.

Merci à ma sœur, à mes grands-parents, à mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines, à belle maman, à mes belles-sœurs, à mes beaux-frères.

Merci à toi qui partage ma vie depuis presque 10 ans.

Merci
Nicolas

Table des matières

Financeurs **1**

Remerciements **2**

Table des matières **4**

Table des illustrations **9**

Liste des abréviations **12**

Historique de la maladie de Parkinson **13**

Rappels bibliographiques **15**

I. Les α-synucléinopathies **15**

La maladie de Parkinson **15**

Neuropathologie de la MP 16

- Dégénérescence de la substance noire 16
- Manifestations cliniques 17
- Les symptômes non-moteurs 18
  - Troubles autonomes 18
  - Troubles neuropsychiatriques 19
  - Troubles sensoriels 20
- Les symptômes moteurs 20
  - Bradykinésie 20
  - Akinésie 21
  - Hypertonie 21
  - Tremblement de repos 22
  - Troubles de l'équilibre : 22

Épidémiologie de la MP 22

- Les cas idiopathiques 22
  - Les facteurs de risques 23
  - Les facteurs protecteurs de la MP 26

La démence à corps de Lewy : 28

Les atrophies multisystématisées : 29

Comparaison entre les 3 synucléinopathies 30

II. L'α-synucléine **31**

Histoire de l'α-synucléine 31
Génétique, structure et fonctions de l'α-synucléine 32
- Génétique de l'a-synucléine 32
- Les trois domaines de l'α-synucléine 33
  - Le domaine N-terminal (1 - 61) : 33
  - Le domaine NAC (62 - 95) : 34
  - Le domaine C-terminal (96 – 140) : 34
- Conformations de l'α-synucléine 34
  - Monomère natif 35
  - Dimère - Trimère 35
  - Tétramère 35
  - Hypothèse d'équilibre dynamique entre toutes les formes 37
- Rôle physiologique de l'α-synucléine 37
- Localisation synaptique de l'α-synucléine 38
- Les interactions membranaires et lipidiques 39
- L'α-synucléine et la dopamine 39
- Activité de protéine chaperon 39

Les autres synucléines 40
La β-synucléine 40
La γ-synucléine 40

III. L'α-synucléine et la maladie de Parkinson 42
Le village italien de Contursi Terme : le « chaînon manquant » entre l'A-syn et la maladie de Parkinson 42
Les corps et neurites de Lewy 43
- Pathologies présentant des corps et neurites de Lewy 43
  - Les CL dans le tronc cérébral 43
  - Les CL dans le cortex 43
- Structure et composition des CL 44

L'a-synucléine pathologique 46
Les gènes liés au parkinsonisme 46
- Les loci PARK et la MP 46
- Les mutations du gène SNCA 47
- Les duplications ou triplications du gène SNCA 48

Modifications post traductionnelles de l'α-synucléine 49
- Phosphorylation en sérine 129 49
  - Qui phosphoryle l'α-syn ? 50

- La forme phosphorylée S129 en conditions physiologiques 50
- Phosphorylation et apparition des inclusions de Lewy 51
- Activation de la voie UPR..... 51
- Les autres modifications post-traductionnelles 52
- Modification de l'homéostasie d'a-synucléine..... 53
- La transconformation de l'α-syn – Le « misfolding » 55
- Formation d'oligoméres et de protofibriles 56

La diffusion de l'α-syn – « *spreading* » 57

IV. Les théories d'initiation de la maladie de Parkinson 60

La théorie de Braak 60

La classification de Braak (Braak *et al.*, 2003) 60

- Stade 1..... 62
- Stade 2..... 62
- Stade 3..... 62
- Stade 4..... 63
- Stades 5 et 6 63
- Vulnérabilité des neurones non myélinisés 64

La théorie du « *double hit* » - Théorie de Braak – (Hawkes *et al.*, 2007) 65

- Les problèmes relatifs à l'odorat..... 65
- Les problèmes relatifs au système nerveux autonome..... 66

L'énoncé de la théorie de Braak 67

Crédibilité de la théorie 68

Théorie alternative : La théorie du seuil 70

Crédibilité de la théorie 71

V. Système nerveux entérique et maladie de Parkinson 73

Le système nerveux central 73

Tronc cérébral..... 73

Bulbes olfactifs..... 74

Le système nerveux entérique 75

Structure anatomique du tube digestif 76

- Bases de l'innervation gastro intestinale 76
  - Le noyau dorsal du nerf vague 77
  - Le nerf vague 78
  - Les ganglions entériques du SNE 78
- La barrière intestinale 80

- Composition des plexus entériques 81
- Les cellules gliales entériques 81

Les atteintes entériques dans la MP 83

Troubles du SNE et MP 83

Les corps de Lewy dans le système nerveux entérique 83

L'α-syn dans le système nerveux entérique 85

Analyse critique des biopsies entériques 85

VI. Les pesticides et la MP 87

Les pesticides 87

Définition réglementaire 87

Usage des pesticides en France 88

Les modalités d'exposition aux pesticides 89

- L'exposition professionnelle 89
- L'exposition de la population générale 90

Liens entre pesticides et MP 92

Roténone 92

Paraquat 93

Mécanismes de toxicité du Paraquat 94

- Le paraquat et la dopamine 95
- Stress oxydatif 96
- Formation d'agrégats d'α-synynucléine 97
  - Le gavage intragastrique 104
  - La dilution du paraquat dans l'eau de boisson 105

Discussion et perspectives 159

Résumé des points clés 159

Discussion 159

Choix d'une modalité d'exposition orale au paraquat 161

Distribution physiologique de l'α-synucléine 163

Le devenir du paraquat suivant l'ingestion 164

Les effets du paraquat sur l'a-synucléine 166

Théories d'initiation de la maladie de Parkinson 171

Perspectives 175

Conclusion 177

Liste des publications acceptées pendant le doctorat 178

Bibliographie 179

Résumé 199

Table des illustrations

FIGURE 1 : GRAINES DE LA PLANTE *MUCUNA PRURIENS*, AUSSI APPELÉ POIS MASCATE 13

FIGURE 2 : COMPARAISON MACROSCOPIQUE DE LA SN DANS UN INDIVIDU SAIN (**A**) ET CHEZ UN PATIENT PARKINSONIEN (**B**). LA SUBSTANCE NOIRE APPARAIT NETTEMENT MOINS PIGMENTÉE CHEZ LE PATIENT ATTEINT PAR LA MP. 17

FIGURE 3 : CINÉTIQUE D'APPARITION DES MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA MP. MOR : MOUVEMENTS OCULAIRES RAPIDES. ADAPTÉ DE (KALIA ET LANG, 2015)..... 18

FIGURE 4 : STRUCTURE CHIMIQUE DU MPPP ET DU MPTP (BOVÉ *ET AL.*, 2005). 24

FIGURE 5 : EXEMPLE DE PESTICIDES LIÉS ÉPIDÉMIOLOGIQUEMENT À LA MP. LES DEUX PESTICIDES LES PLUS LIÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUEMENT À LA MP DANS CETTE ÉTUDE SONT LE PARAQUAT ET LA ROTÉNONE (TANNER *ET AL.*, 2011)..... 25

FIGURE 6 : COMPARAISON ENTRE LES 3 SYNUCLÉINOPATHIES EN TERMES DE PRÉSENTATION CLINIQUE ET D'HISTOPATHOLOGIE. NNI : NON-NEURONAL INCLUSIONS. ADAPTÉ DE (MCCANN *ET AL.*, 2014) 30

FIGURE 7 : RAIE ÉLECTRIQUE TORPEDO CALIFORNICA. WIKIMEDIA COMMON 31

FIGURE 8 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU CHROMOSOME 4 HUMAIN CONTENANT LE GÈNE DE L'A-SYN. LA FLÈCHE JAUNE CORRESPOND À LA LOCALISATION DU GÈNE SNCA. IMAGE ISSUE DU GHR NIH - GENOME DECORATION PAGE..... 32

FIGURE 9 : **REPRÉSENTATION STRUCTURALE DE L'A-SYN.** PROTÉINE PRÉSENTÉE DU COTÉ N TERMINAL (BLEU) AU CÔTÉ C-TERMINAL (ROUGE). LES DEUX HÉLICES A DE L'A-SYN SONT VISIBLES SUR CETTE REPRÉSENTATION. SCHÉMA ISSU DU SITE INTERNET PROTEIN DATA BANK (*HTTPS://WWW.RCSB.ORG/PDB/NGL/NGL.DO?PDBID=1XQ8)*). 33

FIGURE 10: **REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES 3 GRANDS DOMAINES DE L'A-SYN** : LE DOMAINE N-TERMINAL, LE DOMAINE NAC (NON-AMYLOID COMPONENT) ET LE DOMAINE C-TERMINAL. LES RÉPÉTITIONS DU DOMAINE KTKEGV CONSERVÉ PHYLOGÉNÉTIQUEMENT SONT REPRÉSENTÉES SUR CE SCHÉMA (BUTLER *ET AL.*, 2017). 33

FIGURE 11 : PROPOSITION DE STRUCTURE TÉTRAMÈRIQUE DE L'A-SYN. TIRÉ DE (PASLAWSKI *ET AL.*, 2016) 36

FIGURE 12 : CETTE FIGURE MET EN AVANT LES LOCALISATIONS INTRACELLULAIRES DE L'A-SYN. CETTE PROTÉINE EST PRÉSENTE DANS TOUTES LES TERMINAISONS PRÉSYNAPTIQUES DU CERVEAU, MONTRANT UNE IMPLICATION DANS LE TRAFIC VÉSICULAIRE, ELLE A LA CAPACITÉ DE SE LIER AUX MEMBRANES, ET ELLE PEUT ÊTRE DÉGRADÉE PAR LE SYSTÈME UBIQUITINE/PROTÉASOME. LES OLIGOMÈRES DE L'A-SYN POURRAIENT ÊTRE TOXIQUE POUR TOUS LES MÉCANISMES CELLULAIRES LES PLUS BASIQUES (FONCTIONS LYSOSOMALE, MITOCHONDRIALES ET GOLGIALE). FIGURE EXTRAITE DE (DEHAY *ET AL.*, 2015)..... 38

FIGURE 13 : DIFFÉRENCE STRUCTURALE ENTRE LES CORPS DE LEWY VUS DANS LA SUBSTANCE NOIRE ET LES CORPS DE LEWY CORTICAUX. **A**. CORPS DE LEWY PRÉSENT DANS LE TRONC CÉRÉBRAL. **B**. CORPS DE LEWY PRÉSENT DANS LE CORTEX D'UN PATIENT PRÉSENTANT UNE MALADIE À CORPS DE LEWY. CL : CORPS DE LEWY. ADAPTÉ DE (KOSAKA, 2014). 44

FIGURE 14 : CORPS ET NEURITES DE LEWY PRÉSENTS DANS LES NEURONES DOPAMINERGIQUES DE LA SUBSTANCE NOIRE. **A.** COLORATION À L'HÉMATOXYLINE ÉOSINE. **B.** MARQUAGE DE CES CORPS DE LEWY PAR L'A-SYN PHOSPHORYLÉE. **C.** OBSERVATION DE NEURITES DE LEWY MARQUÉES PAR L'A-SYN PHOSPHORYLÉE. LES CORPS DE LEWY SONT INDIQUÉS PAR DES FLÈCHES NOIRES ET LES NL SONT INDIQUÉES PAR UNE FLÈCHE BLANCHE. 45

FIGURE 15 : MODIFICATIONS GÉNÉTIQUES OU POST-TRADUCTIONNELLES POSSIBLES SUR L'A-SYN. TIRÉ DE (BARRETT ET TIMOTHY GREENAMYRE, 2015). 46

FIGURE 16 : REPRÉSENTATION DE LA PROTÉINE A-SYN METTANT EN EXERGUE LES MUTATIONS A30P, E46K, H50Q ET A53T. IL EST À NOTER QUE LA MUTATION A30P SE SITUE SUR UNE HÉLICE A DIFFÉRENTE DE CELLE DANS LAQUELLE SONT LOCALISÉS LES MUTATIONS E46K, H50Q ET A53T. CECI POURRAIT MONTRER UN MÉCANISME PATHOLOGIQUE COMMUN POUR CES MUTATIONS. EXTRAIT DE (APPEL-CRESSWELL *ET AL.*, 2013) 48
FIGURE 17 : PRÉCISION SUR LA LOCALISATION DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES VUES SUR LA PROTÉINE D'A-SYN. TIRÉ DE (OUESLATI, 2016)..... 49
FIGURE 18 : SCHÉMA DE LA PATHOGÉNIE DE L'A-SYN DEPUIS SA TRANSCRIPTION JUSQU'À SA PROPAGATION À UNE CELLULE VOISINE. ADAPTÉ DE (WONG ET KRAINC, 2017)..... 53
FIGURE 19 : MÉCANISMES MENANT À LA FORMATION D'OLIGOMÈRES PATHOLOGIQUES DE L'A-SYN. ADAPTÉ DE (INGELSSON, 2016)55
FIGURE 20 : SCHÉMA DE LA MODIFICATION DE STRUCTURE DE L'A-SYN. **A**. STRUCTURE EN HÉLICE A. **B**. STRUCTURE EN FEUILLETS BÉTA. TIRÉ DE (ZHANG *ET AL.*, 2014). 55
FIGURE 21 : DEPUIS LE MONOMÈRE DE L'A-SYN JUSQU'AUX FIBRILLES. PROPOSITION D'ASSEMBLAGE PATHOLOGIQUE DU MONOMÈRE SOLUBLE EN FIBRILLES PATHOLOGIQUES (ZHANG *ET AL.*, 2013)..... 56
FIGURE 22 : DÉTAIL DE 6 MÉCANISMES POSSIBLES DE DIFFUSION DE L'A-SYN DE CELLULE À CELLULE. **1**. PAR MORT CELLULAIRE ET DÉVERSEMENT DU CONTENU CYTOPLASMIQUE DANS LA MATRICE INTRACELLULAIRE. **2**. DE FAÇON TRANSMEMBRANAIRE. **3**. PAR DES MÉCANISMES D'ENDOCYTOSE/EXOCYTOSE. **4**. PAR BOURGEONNEMENT EXOSOMAL CONTENANT DES PROTÉINES D'A-SYN. **5**. PAR DES CONNECTIONS ENTRE 2 CELLULES APPELÉES « NANOTUBE ». **6**. DIFFUSION DE MANIÈRE TRANS-SYNAPTIQUE. ADAPTÉ DE (VISANJI *ET AL.*, 2013)..... 59
FIGURE 23 : CLASSIFICATION DE LA MP SELON BRAAK. **A.** PHASES PRÉ-SYMPTOMATIQUES ET SYMPTOMATIQUES SELON LA CLASSIFICATION DE BRAAK (BRAAK 2004). LES PREMIÈRES INCLUSIONS INTRACYTOPLASMIQUES DE LEWY SONT DÉTECTÉES DANS LE NOYAU DORSAL DU NERF X PUIS SE PROPAGENT EN SUIVANT LES RÉSEAUX NEURONAUX. LA PENTE ET LES COULEURS SITUÉES SOUS LA DIAGONALE INDIQUENT LA SÉVÉRITÉ DE LA NEUROPATHOLOGIE DÉTECTÉE DANS LA ZONE DÉSIGNÉE. **B**. SCHÉMA DE LA PROPAGATION DE LA PATHOLOGIE SELON L'HYPOTHÈSE DE BRAAK, LES FLÈCHES BLANCHES DÉSIGNENT LA PROGRESSION DE LA PATHOLOGIE. 61
FIGURE 24 : VULNÉRABILITÉ SÉLECTIVE DES NEURONES EN FONCTION DE LEUR MYÉLINISATION. EXTRAIT DE BRAAK ET AL., 2007..... 65
FIGURE 25 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DEUX VOIES D'ENTRÉE DE L'AGENT PATHOGÈNE NEUROTROPE SELON LA THÉORIE DE BRAAK. **A**. BULBES OLFACTIFS ET NEURONES OLFACTIFS. **B**. SCHÉMA DE L'INNERVATION DU SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE, RELIÉ AU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL PAR LE NERF VAGUE. ADAPTÉ DE BRAAK ET AL., 2007. 67
FIGURE 26 : COMPARAISON ENTRE (**A**) LA DISTRIBUTION DES CORPS DE LEWY OBSERVÉS DANS LA MP ET (**B**) LES ZONES PRÉSENTANT DES PERTES NEURONALES. CES ZONES NE SE SUPERPOSENT PAS PARFAITEMENT. ADAPTÉ DE (SURMEIER *ET AL.*, 2017)..... 72
FIGURE 27 : STRUCTURE NEURO-ANATOMIQUES DU TRONC CÉRÉBRAL ET DES NEURONES OLFACTIFS. A. REPRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS NOYAUX DES NERFS CRÂNIENS, ENCADRÉ EN ROUGE, LE NOYAU DORSAL DU NERF VAGUE. B. REPRÉSENTATION DU BULBE OLFACTIF ET DE SA CONNEXION AVEC L'ENVIRONNEMENT EXTÉRIEUR PAR LES NEURONES OLFACTIFS. CES NEURONES PEUVENT CAPTER LES MOLÉCULES ODORANTES MAIS AUSSI ILS PEUVENT ÊTRE MIS EN CONTACT DIRECTEMENT AVEC DES NEUROTOXIQUES DE L'ENVIRONNEMENT EXTÉRIEUR..... 74
FIGURE 28 : CONNEXIONS ENTRE LE TC ET LE SNE. LE NERVE VAGUE PROJETTE DIRECTEMENT DANS LES PLEXUS ENTÉRIQUES POUR LES ACTIONS PARASYMPATHIQUES, LES PROJECTIONS SYMPATHIQUES SONT D'ABORD REÇUES PAR UN GANGLION PRÉVERTÉBRAL. ADAPTÉ DE (RAO ET GERSHON, 2016) 77

Figure 29 : Représentation schématique de la structure du SNE. Deux plexus nerveux sont identifiés, le plexus myentérique, appelé plexus d'Auerbach, et le plexus sous-muqueux, appelé plexus de Meissner. Adapté de (Rao et Gershon, 2016), source Wikimédia common. 78
Figure 30 : Structure simplifiée des connexions entre les ganglions entériques. Le nerf vague innerve directement le plexus myentérique, lequel convoie l'information de contraction aux couches musculaires circulaires ou longitudinales. Ce plexus est aussi relié au plexus sous muqueux, lequel projette vers différents types de cellules dans la muqueuse intestinale. Adapté de (Gulbransen et Sharkey, 2012) 79
Figure 31 : Représentation de la distribution des cellules gliales entériques dans le système nerveux entérique. En rouge, les CGE distribuées dans les plexus entériques mais aussi le long de l'épithélium, en noir les somas des neurones entériques schématisés dans les plexus. Tiré de (Yu et Li, 2014) 82
Figure 32: Données sur les quantités de pesticides vendues en France de 1996 à 2014. Sources UIPP et Banque nationale des ventes pour les distributeurs. 87
Figure 33 : Les pesticides et la France. **A**. Infographie de ministère de l'agriculture concernant la contamination des eaux de surface par des résidus de pesticides. **B**. Étude sur l'alimentation totale EAT menée par l'ANSES étudiant les résidus de pesticides sur l'alimentation et leur respect des normes sanitaires. 90
Figure 34 : La roténone. **A**. Structure chimique de la roténone. **B**. La plante *Paraderris elliptica*, espèce dont peut être extraite la roténone. 92
Figure 35 : Structure du MPTP et du paraquat. Les deux molécules partagent une certaine homologie 93
Figure 36 : Comparaison structurelle entre le MPTP et la dopamine, adapté de (Jakowec et Petzinger, 2004) 96
Figure 37 : Voie de création des ROS par le paraquat, induisant un stress oxydatif généré en continue dans la cellule. Adapté de (Cocheme et Murphy, 2008). 96
Figure 38 : Représentation schématique du format de test ELISA adapté de Emmanouillidou et al. 2011. Capture de la protéine d'intérêt avec l'anticorps Clone 42 et détection de celle-ci avec l'anticorps C20-R. Détection de ce complexe avec anticorps un secondaire dirigé contre les anticorps lapins, couplé à la peroxydase de Raifort (HRP). 127

Liste des abréviations

α-syn : α-synucléine
β-syn : β-synucléine
γ-syn : γ-synucléine
A53T : Mutation familiale Arginine vers Thréonine sur l'acide aminé 53 de l' α-synucléine
AMM : Autorisation de mise sur le marché
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, environnement et travail
BHE : Barrière hématoencéphalique
CGE : cellules gliales entériques
C-terminal : domaine carboxy-terminal
DAT : Dopamine Transporter
DCL : Démence à corps de Lewy
DMV : noyau dorsal du nerf vague (Dorsal Motor nucleus of Vagus nerve)
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
HS : Heat Shock protein
IPAN : neurones afférents primaires intrinsèques (*Intrinsic primary afferent neurons*)
MA : Maladie d'Alzheimer
MND : Maladies NeuroDégénératives
MOR : Mouvements oculaires rapides
MP : Maladie de Parkinson
MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MSA : atrophie multisystématisée, (*Multiple System Atrophy*)
MSA : Mutuelle sociale agricole
NAC : Composant non –amyloïde (*Non-amyloidic component*)
N-terminal : domaine amino-terminal
ROS : dérivé réactif de l'oxygène (*Reactive oxygen species*)
Ser129 : Sérine 129
SN : Substance noire
SNC : Système nerveux central
SNE : Système nerveux entérique
SNpc : Substance noire *pars compacta*
TC : Tronc cérébral
TH : Tyrosine Hydroxylase
UPR : Unfolded Protein Response

Historique de la maladie de Parkinson

Les premières descriptions empiriques de la maladie de Parkinson (MP) remontent à plus de 3000 ans. Que ce soit en Inde, en orient ou en occident, cette maladie a été rencontrée sur plusieurs continents à travers les âges. Ce chapitre fait état de trois descriptions à différentes périodes retraçant quelques millénaires de MP.

600 avant J.-C.

La première description d'une pathologie très proche de la MP remonte bien avant les aires industrielles de deux derniers siècles. La médecine ayurvédique indienne fait état d'une pathologie nommé « *Kampavata* », dont les signes cliniques sont des tremblements excessifs et une rigidité générale.

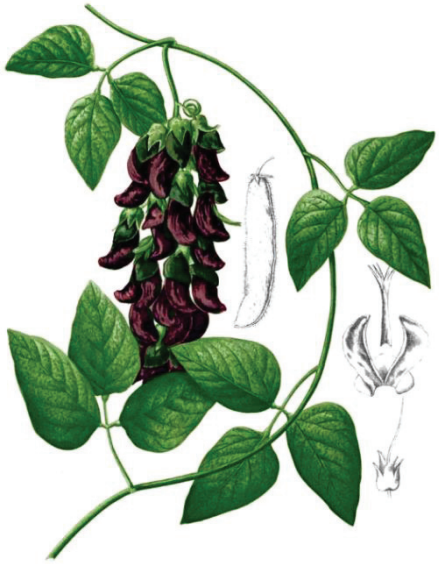


Figure 1 : Graines de la plante *mucuna pruriens*, aussi appelé pois mascate

Cette maladie a été décrite par Susruta dans le recueil « Susruta Samhita » au 6ème siècle avant J.-C. Là où l'histoire devient particulièrement intéressante c'est que cette médecine traditionnelle propose un remède à cette maladie dans cet ouvrage : la consommation de pois Mascate (*mucuna pruriens*), apparaissant sur la Figure 1.
Cette graine retrouvée sur des arbres semblables à notre Glycine occidentale, se retrouve en Asie ou en Afrique. La particularité de cette graine est qu'elle contient en grande quantité de la L-Dopa, une molécule encore utilisée de nos jours pour traiter les symptômes de la MP.

19ème siècle

La MP telle que l'on l'entend de nos jours, a été identifiée et décrite il y a exactement 200 ans par James Parkinson dans son essai « An essay on the shaking palsy », publié en 1817. Une version restaurée de cet essai a été publiée en 2002 dans le journal

Neuropsychiatry Classics (Parkinson, 2002). Aussi loin que la publication de cet essai remonte, la plupart des observations faites par ce pathologiste anglais restent valides et actuelles. Appelée d'abord *Paralysis Agitans, cette pathologie est décrite par les phrases suivantes :*

> *« Des mouvements tremblants involontaires, avec un tonus musculaire réduit, en partie en inaction et même avec de l'aide ; Avec une propension à avoir une posture courbée, et passer d'un pas lent à un pas rapide ; les sens et l'intellect ne sont pas atteints. »*

> *« Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forwards, and to pass from a walking to a running pace: the senses and intellects being uninjured. »*

L'étude de 6 patients atteint d'une pathologie semblable caractérisée par des tremblements, a permis cette première description de la MP, expliquant en détail la symptomatologie et le mode de vie de chaque cas. Il est à noter que des désordres gastriques sévères étaient déjà vus dans cet essai, chez les patients étudiés.

De nos jours

L'histoire riche de la Maladie de Parkinson a permis d'en comprendre une partie des causes et comment la ralentir ou en traiter une partie des symptômes. Cependant beaucoup de travail reste encore à être mené pour comprendre parfaitement les mécanismes moléculaires et cellulaires à la base de la pathogenèse de la MP et des autres α-synucléinopathies.

Rappels bibliographiques

I. Les α-synucléinopathies

Les maladies neurodégénératives représentent un vrai défi pour la recherche fondamentale et clinique. En France, d'après les chiffres du ministère des Solidarités et de la Santé, plus de 850 000 personnes sont touchées par la maladie d'Alzheimer (MA), 200 000 par la maladie de Parkinson (MP) et 100 000 par la sclérose en plaque. La MP est donc la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue en France. Cette maladie ne change pas l'espérance de vie, mais elle affecte particulièrement la qualité de vie. La MP fait partie d'un groupe de maladies liées à une protéine neuronale, l'α-synucléine (α-syn), appelées les α-synucléinopathies.

La famille des α-synucléinopathies comporte au moins trois membres : La MP, la démence à corps de Lewy (DCL) et l'atrophie multisystématisée (MSA).

La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative se caractérisant par une évolution progressive et lente de symptômes moteurs délétères. Les causes de cette maladie peuvent être divisées en deux groupes distincts : les cas familiaux, dus à des anomalies génétiques, et les cas idiopathiques, dont l'étiologie multifactorielle ne permet pas d'identifier clairement la cause du déclenchement de la maladie. Les symptômes de la maladie de Parkinson sont assez facilement identifiables, caractérisés par des tremblements incontrôlés, une rigidité et une posture voûtée. Ces symptômes sont dus à la dégénérescence de neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire du cerveau des individus atteints, dont les neurones présentent des corps d'inclusions intracytoplasmiques composées majoritairement d'α-syn. Cette dégénérescence est due à l'accumulation de protéine d'α-syn au niveau de ces neurones (Kalia et Lang, 2015).

De nos jours, la MP aussi est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente dans le monde, elle affecte environ 4% de la population française ayant plus de 60 ans. Son incidence et sa prévalence sont variables en fonction du pays et des études épidémiologiques. En France, l'incidence annuelle de la MP est de 36 à 49 pour 100 000 par ans, toutes populations confondues. Si l'on considère des intervalles d'âge, l'incidence de la MP augmente à 139-172 pour 100 000 habitants dans l'intervalle 65-74 ans, à 251-313 pour 100 000 chez les personnes âgées de plus de 85 ans et de sexe masculin. La prévalence de la MP est là aussi différente selon l'intervalle d'âge considéré, elle est de 293-376 pour 100 000 dans la tranche d'âge 55 – 64 et augmente jusqu'à 3760-4578 pour 100 000 en considérant les personnes âgées de plus de 85 ans. (Blin *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2014).

Neuropathologie de la MP

L'une des particularités de la MP est qu'elle est le plus souvent diagnostiquée lors de l'apparition des premiers symptômes moteurs caractéristiques de la maladie. Cependant, ces symptômes ne marquent pas le début de la maladie, celle-ci s'est déclenchée une voire deux décennies précédent l'apparition de ces symptômes. (Prigent *et al.*, 2017)

Dégénérescence de la substance noire

L'élément clé dans la neuropathologie de la MP est la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la partie *pars compacta* de la substance noire (SN), visible sur la Figure 2. Découverte en 1786 par Félix Vicq d'Azyr, médecin et anatomiste français, cette partie des ganglions de la base possède de nombreux rôles dans les mouvements et la récompense. Anatomiquement, la SN est constituée de deux parties : la SN *pars compacta*, composée principalement de neurones dopaminergiques facilement identifiables par un examen macroscopique car ils sont pigmentés par de la neuromélanine, et la SN *pars reticulata*, moins dense que la SN *pars compacta,* elle possède une forme réticulée car elle est composée principalement de projections neuronales (Barter *et al.*, 2014; Parent et Parent, 2010).

Parmi les fonctions de la SN *pars compacta*, certaines seraient impliquées dans le mouvement, même si le rôle de la SN dans le contrôle moteur est indirect ; car la stimulation électrique de cette zone n'entraîne pas de mouvement. Cependant, la dégénérescence de la

SN *pars compacta* a une grande influence sur le mouvement, comme en témoignent les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. En effet son activation par des stimuli électriques n'engendre pas de mouvements chez le rat, son rôle résiderait donc dans la régulation du mouvement par l'inhibition (Wu *et al.*, 2012). Cette perte d'inhibition du mouvement inhérente aux neurones dopaminergiques de la SN *pars compacta* expliquerait en partie les tremblements observés dans la MP.

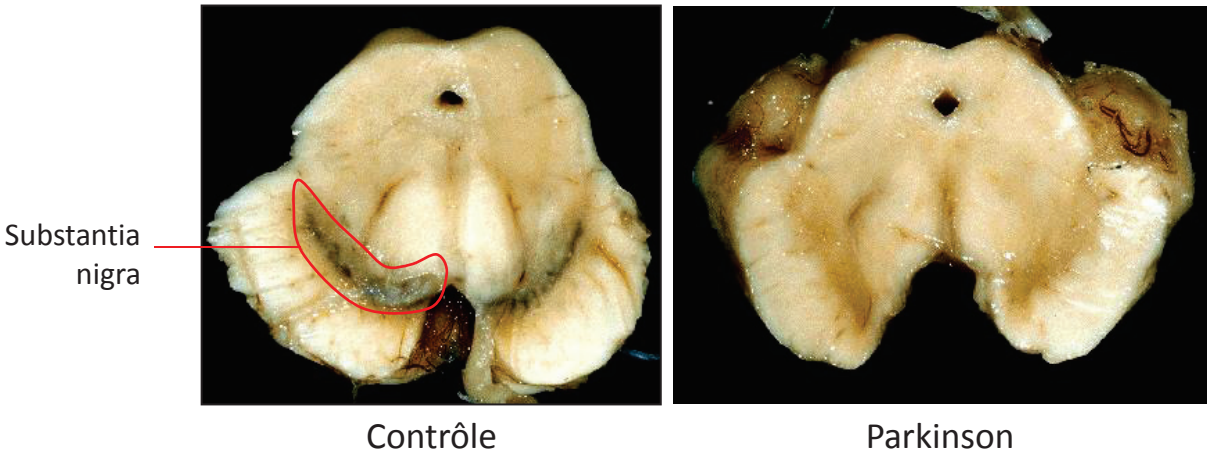


Figure 2 : Comparaison macroscopique de la SN dans un individu sain (**A**) et chez un patient Parkinsonien (**B**). La substance noire apparait nettement moins pigmentée chez le patient atteint par la MP.

Il est à noter que la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire est associée à l'accumulation d'une forme pathologique hyperphosphorylée de l'α-syn. (Wang *et al.*, 2012).

Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de la MP peuvent être regroupées en deux grandes familles, les symptômes non-moteurs et les symptômes moteurs. La particularité de ces deux groupes de symptômes est que les symptômes non moteurs apparaissent une à deux décennies avant les premiers signes cliniques moteurs caractéristiques de la MP (Figure 3). Il est donc d'intérêt de travailler ces phases précoces et asymptomatiques de la maladie car plus la maladie est décelée tôt, plus un traitement peut être administré tôt, afin de ralentir sa progression (Hughes *et al.*, 2002; Sveinbjornsdottir, 2016).

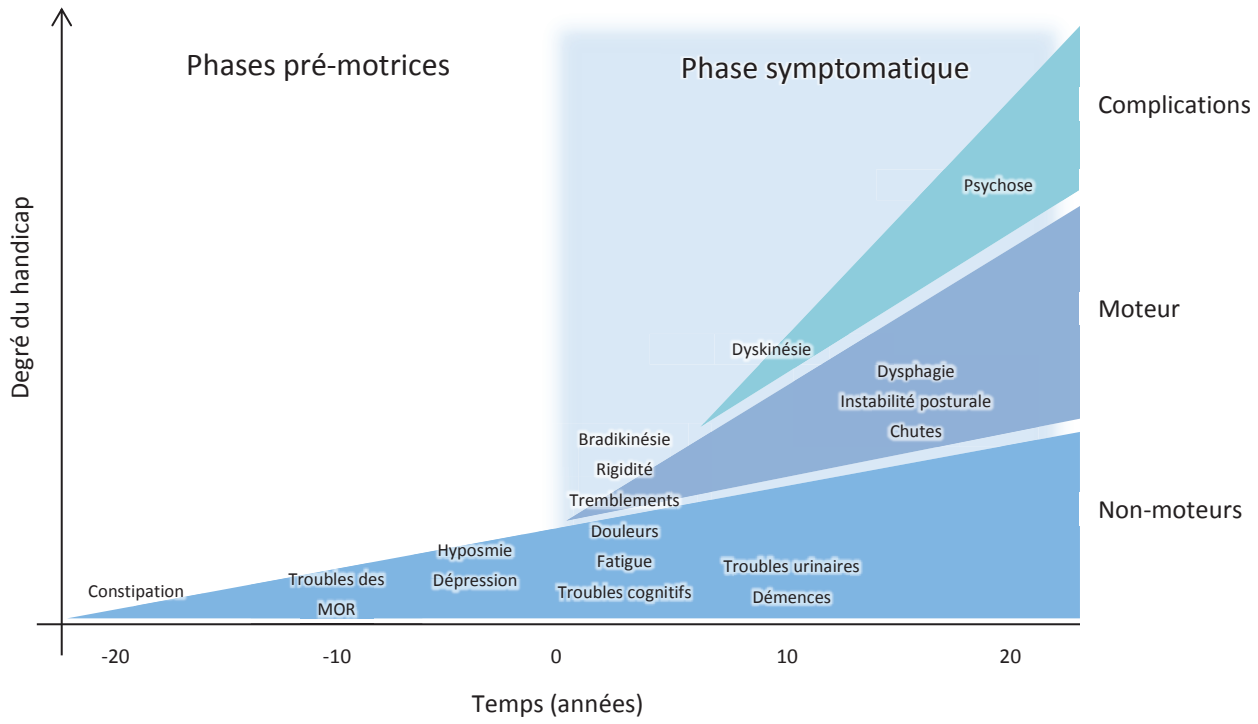


Figure 3 : Cinétique d'apparition des manifestations cliniques de la MP. MOR : Mouvements oculaires rapides. Adapté de (Kalia et Lang, 2015)

Les symptômes non-moteurs

Les symptômes non-moteurs de la MP se présentent sous une multitude de manifestations non spécifiques. Ces symptômes peuvent être des anomalies dans la régulation des cycles circadiens, des fonctions cognitives défaillantes, des troubles du système nerveux autonome ainsi que des défauts d'intégration sensorielle. Ces symptômes apparaissent une à deux décennies avant la phase symptomatique (Poewe, 2008).

Troubles autonomes

Des dysfonctionnements du système nerveux autonome sont présents dans la quasi-totalité des cas de MP. Ces troubles touchent le système digestif, le système urogénital, et la régulation de la tension artérielle. (Micieli *et al.*, 2003)

- D'un point de vue clinique, la constipation désigne un prolongement du temps de transit intestinal. Elle est présente, selon les études, chez 28 à 61% des patients atteint de la MP (Edwards *et al.*, 1991; Kaye *et al.*, 2006; Visanji et Marras, 2015).

Cette constipation ne serait pas due à une dénervation sympathique colique des plexus myentériques (Corbille *et al.*, 2014).

- Le système urogénital présente aussi des atteintes chez les patients parkinsoniens. Ces troubles se traduisent par des troubles de l'érection, des fuites urinaires, des mictions incomplètes et de l'incontinence. (Jost, 2013; Swaminath *et al.*, 2010)
- Des hypotensions orthostatiques, désignant le fait de subir une baisse de tension en passant de la posture allongée à la posture debout, affectent environ 20 à 30% des patients atteints par la MP (Micieli *et al.*, 2003).

Troubles neuropsychiatriques

Contrairement à l'étude de cas publiée par James Parkinson en 1817, où il est rapporté que la MP n'affecte pas l'intellect ni les sens, il est montré que des troubles neuropsychiatriques sont présents chez les patients parkinsoniens.

- La dépression affecte de 4 à 70% des patients. Cette dépression se manifeste par des pertes d'intérêt, de la fatigue et de l'anhédonie. Le patient peut aussi présenter des crises d'angoisse (Hemmerle *et al.*, 2012; Marsh, 2013; Rihmer *et al.*, 2014).
- Les troubles du sommeil font partie des symptômes non moteurs les plus fréquents et comprennent une multitude de désordres liés au sommeil tels que des difficultés d'endormissement, un sommeil léger menant à des phases de réveil fréquentes et des crampes nocturnes. Surtout, les patients atteints de MP ont des perturbations du sommeil paradoxal, présentes durant les phases de mouvements oculaires rapides. Les patients perdent dans ces phases l'atonie musculaire associée au sommeil, conduisant à une activité motrice calquée sur l'activité cérébrale. Ceci mène à des rêves lucides que les patients décrivent comme effrayants, conduisant à un comportement éventuellement violent, voire dangereux, tant pour le patient que pour son partenaire (Poryazova *et al.*, 2013).
- Des psychoses et démences sont aussi vues dans la MP. Les psychoses se traduisent par des hallucinations visuelles (vues chez 30% des patients) et des délires (5% des patients). Ces troubles peuvent mener à des démences (Friedman, 2013).

Troubles sensoriels

L'autre aspect des symptômes non-moteurs de la MP est l'atteinte des systèmes sensoriels et somatosensoriels, notamment dans l'intégration de la douleur et des informations provenant des sens.

- Hyposmies et anosmies sont repérées dans environ 90% des cas de MP. Ces pertes de goût et d'odorat sont associées à une neuropathologie des bulbes olfactifs La présence de ces symptômes pourrait être prédictif d'une démence associée à Parkinson. (Hawkes *et al.*, 1997; Pearce *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 2014; Ubeda-Banon *et al.*, 2014).
- Des douleurs chroniques sont aussi liées à la MP. Ces douleurs peuvent être des sensations de brûlure, de picotement, ou même des douleurs d'intensité beaucoup plus forte. Les mécanismes biologiques de ces douleurs fantômes sont encore peu compris, mais celles-ci seraient présentes dans 40 à 60% des cas de MP (Ford, 2010; Simuni et Sethi, 2008).

Ces symptômes non-moteurs, pour la plupart associés à la phase pré-symptomatique de la MP, pourraient être utilisés à des fins prédictives sachant que ces symptômes apparaissent plusieurs années avant le déclenchement des symptômes moteurs.

Les symptômes moteurs

La maladie de Parkinson est caractérisée par un spectre de symptômes large, plus ou moins spécifiques, rendant son diagnostic dans les premières phases symptomatiques (motrices) difficile. La symptomatologie motrice est la plus visible et handicapante. Lors de l'apparition des premiers symptômes moteurs majeurs de la MP, environ 70% des neurones dopaminergiques du système nigrostrié sont déjà détruits. La maladie est diagnostiquée pour la plupart des cas lors de l'apparition des premiers symptômes moteurs. Ces symptômes majeurs sont :

Bradykinésie

La bradykinésie est un symptôme constitutif la MP se traduisant par une lenteur dans l'exécution des mouvements volontaires. Cette lenteur se traduit par plusieurs traits phénotypiques caractéristiques de la MP, handicapant dans la vie quotidienne. Au niveau

des membres inférieurs la bradykinésie se repère par une démarche ralentie, avec des pas plus rapprochés (Schilder *et al.*, 2017). Au niveau des membres supérieurs cela se repère par la difficulté d'effectuer des actions telles que l'écriture, les tâches ménagères ou l'hygiène quotidienne. Au niveau du visage, les expressions sont moins marquées, accompagnées par des changements de la voix, plus faible et plus atone. Les mimiques du visage s'estompent. Au niveau de la bouche, la lenteur dans les mouvements entraine des troubles de la déglutition menant, dans les phases avancées de la MP, à des dénutritions sévères nécessitant une prise en charge médicale et adaptée. Des pertes de salive sont aussi courantes chez les patients atteints d'une bradykinésie, résultant d'une équation simple : si les déglutitions sont plus espacées, la salive se retrouve en excès dans la bouche. (Pal et Goetz, 2013)

Akinésie

L'akinésie est en quelque sorte un symptôme allant de pair avec la bradykinésie. Alors que la bradykinésie est une lenteur dans les mouvements, l'akinésie désigne la lenteur dans leur initiation, pouvant, dans les cas de mouvements volontaires, être exacerbée chez le patient par l'appréhension de réaliser un mouvement ralenti ou mal maîtrisé (Schilder *et al.*, 2017). Ce symptôme est particulièrement handicapant pour les personnes atteintes de la MP en cas de nécessité de mouvement rapide comme lors d'une chute (impossibilité de se rattraper) ou dans l'initiation d'un mouvement de réflexe (retrait d'un membre lors d'une brûlure). La lenteur de l'initiation du mouvement peut donc entraîner d'autres complications plus graves, pouvant mener à des décès (Birkmayer et Hornykiewicz, 1998).

Hypertonie

L'hypertonie musculaire est un symptôme associé à un tonus musculaire trop élevé. Deux types d'hypertonie existent : l'hypertonie plastique où, lors du mouvement volontaire d'un membre, celui-ci résiste et cède par à-coups, et l'hypertonie élastique où le membre en action revient à sa position initiale lors de l'arrêt de la stimulation. Dans le cas de la MP, c'est l'hypertonie plastique qui est le plus souvent rencontrée. La cocontraction des muscles agonistes et antagoniste des membres mène à une rigidité générale du corps, amplifiant la lenteur des mouvements. Cette hypertonie mène à des douleurs musculaires intenses dues à la sur-stimulation des muscles (Hobson, 2003; Schilder *et al.*, 2017).

Tremblement de repos

L'un des signes majeurs de la MP, et surtout le plus apparent, sont les tremblements. Les tremblements sont considérés comme symptomatiques dès lors qu'ils sont involontaires, marqués par une oscillation rythmique et incontrôlable d'un membre, plus souvent à l'extrémité de celui-ci. Dans le cas de la MP, le tremblement est dit « de repos » car il est présent lors des phases de repos du patient, lorsque le muscle n'est pas stimulé. Il est à noter que le tremblement disparait pendant le sommeil et réapparaît lors du réveil. Les tremblements décrits ici sont majoritairement présents sur les mains, les jambes et le menton, dont la fréquence d'oscillation varie de 4 à 7 sursauts par secondes. Ces tremblements sont les symptômes les plus visibles et identifiables de la MP et ils ont la particularité d'apparaître de façon unilatérale (Hallett, 2012; Sveinbjornsdottir, 2016).

Troubles de l'équilibre :

Les troubles de l'équilibre sont une conséquence de tous les symptômes moteurs précédemment décrits. En effet, la combinaison d'une lenteur d'exécution des mouvements, d'une rigidité posturale, d'une rigidité dans l'exécution de mouvements volontaires et de tremblements rend la stature debout particulièrement difficile, obligeant le patient à tenir à une posture voûtée pour partie permettant d'abaisser son centre de gravité (Kimmell *et al.*, 2015).

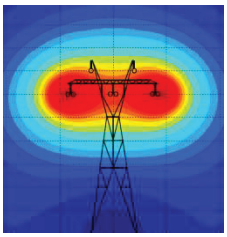
Épidémiologie de la MP

Les causes de la MP sont multiples et incriminer un seul facteur suite à l'apparition de la maladie est presque impossible. L'étiologie de la MP peut être séparée en deux groupes distincts : les cas familiaux et les cas idiopathiques. Dans ce chapitre, seuls les cas idiopathiques seront détaillés, les cas familiaux seront détaillés plus tard dans ce document.

Les cas idiopathiques

La maladie de Parkinson possède une étiologie multifactorielle rendant difficile d'incriminer une cause précise à son apparition. Malgré cela, des facteurs de risque ont pu être identifiés par des études épidémiologiques. Beaucoup de revues de la littérature ou de méta analyse rassemblent ces facteurs (Kieburtz et Wunderle, 2013; Ritz *et al.*, 2007; Van Den Eeden *et al.*, 2003; Wirdefeldt *et al.*, 2011).

Les facteurs de risques



L'âge

La plupart des maladies neurodégénératives partagent ce facteur de risque. Plus un individu vieillit, plus il devient à risque de déclencher une maladie neurodégénérative (MA, MP…). Dans le cas de la MP, James Parkinson faisait déjà ce constat dans son étude de cas de personnes atteintes d'une « *paralysie agitante* » où tous les cas décrits ont un âge avancé. L'incidence de la maladie augmente ainsi dans les tranches d'âge 60-70 ans et 70-90 ans. Ces données suggèrent qu'il existerait des facteurs intrinsèques dans les processus de vieillissement prédisposant au développement de la MP, comme par exemple l'exposition à des facteurs environnementaux (Campdelacreu, 2014). En France, l'âge moyen de diagnostic est de 58 ans, cependant la MP n'abaisserait pas l'espérance de vie, particulièrement pour les patients ne développant pas de démences (Hobson *et al.*, 2010).

Le sexe

La maladie est environ 1,5 fois plus fréquente chez l'homme que chez la femme. La première interprétation pourrait être que les hommes ont une plus grande exposition à certains facteurs environnementaux qui augmentent le risque de la maladie. Plusieurs études ont déjà comparé les taux d'incidence annuels dans les deux sexes (Caslake *et al.*, 2013; Wooten *et al.*, 2004). Cette étude définit un ratio d'incidence homme/femme ajusté selon l'âge de 1,5 (Wooten *et al.*, 2004). Une autre interprétation serait qu'il existe des effets potentiellement protecteurs des œstrogènes ou des effets nocifs de la testostérone en ce qui concerne le développement de la MP. Il a été montré que des femmes ayant subi une ovariectomie étaient plus susceptibles d'avoir une MP que celles qui n'ont pas eu d'opérations, ce qui montrerait un rôle plutôt protecteur des œstrogènes (Rocca *et al.*, 2008). Des études récentes montrent que les différences d'incidence de la MP entre les hommes et les femmes auraient tendance à s'accroitre avec l'âge, soulignant là aussi l'implication d'autres facteurs (Moisan *et al.*, 2016).

Les pesticides

Le lien entre l'exposition à des pesticides et le déclenchement de la MP a été mis en avant dans les années 70 par deux affaires impliquant une erreur de synthèse de drogues.

Premièrement en 1976 un étudiant en chimie a cherché à synthétiser du MPPP, drogue récréative légale, dans un laboratoire improvisé chez lui. La réaction est relativement simple, en partant du N-méthyle-4-pipéridone, composé chimique facilement accessible, transformé en 4-hydroxy-4-phényl-N-méthylpipéridine (HPMP) par du phényllithium, puis en faisant réagir le HPMP avec de l'anhydride propionique le MPPP est créé (Bové *et al.*, 2005). Or cette dernière réaction doit se faire à froid avec une acidité contrôlée sous peine de créer un résidu, le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétra-hydropyridine (MPTP), un neurotoxique puissant induisant une symptomatologie proche de la MP (Langston, 1987).

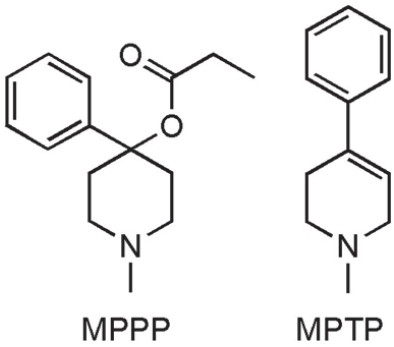


Figure 4 : Structure chimique du MPPP et du MPTP (Bové *et al.*, 2005).

C'est ce qui s'est produit avec l'étudiant, la drogue synthétisée était contaminée par le résidu et il a développé une pathologie proche de la maladie de parkinson en quelques jours. Les symptômes de sa maladie ont été limités par l'administration de Levodopa, molécule pouvant être métabolisée en dopamine, utilisée en traitement de la MP.

L'autre fait marquant, en 1982, est celui d'un groupe de toxicomanes au nord de la Californie qui a développé une symptomatologie proche d'une MP après l'injection intraveineuse d'une drogue de synthèse vendue dans les rues à l'époque, là encore du MPPP contaminé par du MPTP. Au moins 300 personnes auraient consommé cette drogue contaminée, mais seulement une petite dizaine d'entre elles auraient développé un syndrome parkinsonien (Langston *et al.*, 1983). Les toxicomanes ayant développé un syndrome parkinsonien, présentent des symptômes comprenant des tremblements et des rigidités. D'un point de vue histologique, l'analyse *post mortem* du cerveau de l'étudiant en

chimie, suite à une overdose de cocaïne quelques années plus tard, a permis de montrer une perte de neurones dopaminergiques au niveau de la SN, consécutive à son administration de MPTP, démontrant un ciblage spécifique de ces neurones par cette molécule. Le MPTP est un analogue structurel du Paraquat, un herbicide non sélectif très utilisé dans les années 70 et ce, jusque dans les années 2000, développé dans le chapitre 6 de l'introduction de cette thèse (Langston, 1987).

Ainsi, fortes de ces nouvelles perspectives concernant l'étiologie de la MP, des études épidémiologiques ont permis de lier l'exposition à des pesticides utilisés principalement en agriculture avec un déclenchement précoce de la MP, comme le paraquat, le manèb, la dieldrin, les pyréthroïdes ou la roténone (Baltazar *et al.*, 2014). Notamment l'étude de Tanner et al., 2011, a permis d'identifier précisément, grâce à une méta-analyse d'études épidémiologiques, des composés et des familles de composés liés à un déclenchement précoce de la MP chez des individus exposés professionnellement à ces composés. Parmi ces substances, il est montré que l'exposition au paraquat et à la roténone est un facteur de risque pour la MP (Tanner *et al.*, 2011).

Pesticide	Cases (n = 110) [n (%)]	Controls (n = 358) [n (%)]	OR (95% CI)	p-Value
Oxidative stressors				
Paraquat	23 (24)	49 (14)	2.5 (1.4–4.7)	0.004
Permethrin	16 (16)	41 (12)	1.5 (0.77–2.9)	0.244
Carbon disulfide	2 (2)	3 (1)	2.6 (0.41–16)	0.313
Chloranil	1 (1)	3 (1)	1.6 (0.16–16)	0.706
Cyhalothrin	1 (1)	1 (0)	3.8 (0.22–64)	0.359
Dichlone	3 (3)	8 (2)	1.6 (0.40–6.2)	0.517
Mercury compounds	2 (2)	5 (1)	1.4 (0.26–7.5)	0.692
Pybuthrin	0 (0)	6 (2)	NA	
Any oxidative stressor	35 (40)	93 (28)	2.0 (1.2–3.6)	0.012
Mitochondrial complex I inhibitors				
Benomyl	7 (7)	15 (4)	1.9 (0.70–5.0)	0.207
Carbendazim	1 (1)	2 (1)	2.2 (0.19–25)	0.529
Cyhalothrin	1 (1)	1 (0)	3.8 (0.22–64)	0.359
Permethrin	16 (16)	41 (12)	1.5 (0.77–2.9)	0.244
Pyridaben	0 (0)	1 (0)	NA	
Rotenone	19 (19)	32 (9)	2.5 (1.3–4.7)	0.005
Thiabendazole	3 (3)	12 (3)	0.8 (0.23–3.1)	0.778
Any complex I inhibitor	36 (38)	92 (27)	1.7 (1.0–2.8)	0.041

Figure 5 : Exemple de pesticides liés épidémiologiquement à la MP. Les deux pesticides les plus liées épidémiologiquement à la MP dans cette étude sont le paraquat et la roténone (Tanner *et al.*, 2011).

Traumatismes crâniens

Les traumatismes au niveau de la boite crânienne ont récemment fait l'objet d'une attention particulière, notamment chez des individus pratiquant des sports entraînant des

chocs répétés à la tête comme la boxe, le hockey sur glace, le rugby, le football ou les arts martiaux. Ces chocs à la tête menant à des lésions cérébrales traumatiques ont également été associés au développement de la MP (Cruz-Haces *et al.*, 2017; Gavett *et al.*, 2010) . Des études épidémiologiques ont lié la durée de l'inconscience suite à un choc à la tête avec le risque de développer une MP (Goldman *et al.*, 2006). Ainsi, une inconscience supérieure à 5 minutes suite à un choc, doublerait la probabilité de déclencher une MP par la suite. Cependant les mécanismes de pathogenèse avec ce facteur de risque n'est pas clair. Certaines études mettent en avant un affaiblissement de la BHE suite à un traumatisme crânien (Chodobski *et al.*, 2011), ou alors l'induction d'une inflammation (Jafari *et al.*, 2013).

Les champs électromagnétiques

L'idée que l'exposition à des champs électromagnétiques soit un facteur de risque de la MP est discutée. Certaines études ont montré l'innocuité de ces champs magnétiques concernant l'initiation de la MP (Johansen, 2000; Savitz *et al.*, 1998; van der Mark *et al.*, 2015), alors que d'autres ont montré un lien de causalité entre l'exposition professionnelle, notamment pour des individus ayant des métiers relevant de l'industrie électriques (Hug *et al.*, 2006).

Les facteurs protecteurs de la MP

Le tabagisme

Beaucoup d'études ont montré caractère protecteur du tabagisme sur la MP, c'est d'ailleurs le facteur environnemental le plus protecteur face à la MP (Wirdefeldt *et al.*, 2011). En effet la nicotine est un alcaloïde stimulant les neurones dopaminergiques et inhibant la formation de fibrilles d'α-syn. Il a d'ailleurs été montré que la nicotine stabilise les oligomères d'α-syn solubles *in vitro* (Hong *et al.*, 2009). L'autre aspect protecteur de la nicotine est qu'elle peut diminuer les symptômes de la MP par l'activation de récepteurs

nicotiniques (Quik *et al.*, 2007). Malgré le caractère protecteur du tabac face à la MP, celui-ci reste quand même la première cause de décès par cancer du poumon (Warren et Cummings, 2013). Il est à noter que la consommation de nicotine par toute méthode substitutive aidant à l'arrêt de la cigarette aurait le même effet neuroprotecteur que la cigarette elle-même (Quik *et al.*, 2008). Patchs, gommes, sprays à la nicotine et plus récemment le vapotage pourraient donc être de nouveaux alliés dans la prévention, voire même en complément de traitement de la MP.

La consommation de café et de thé

La consommation de café, de thé ou d'autres produits caféinés tels que les boissons énergétiques ou des compléments alimentaires à base de caféine, a été liée à une baisse de l'incidence de la MP (Ross *et al.*, 2000). Beaucoup d'études épidémiologiques sont équivoques sur le rôle neuroprotecteur de la caféine dans les pathologies neurodégénératives. Cependant les mécanismes protecteurs précis restent à être élucidés. La caféine est un antagoniste de l'adénosine A2A et des études ont montré que l'activation de ce type de récepteurs était clairement protectrice (Morelli, 2003). Une hypothèse concernant les mécanismes neuroprotecteurs de la caféine (et de la nicotine) impliquerait une modification de la flore intestinale consécutive à la consommation de boisson caféinées, inhibant en partie l'inflammation intestinale (Derkinderen *et al.*, 2014).

L'alcool

L'alcool pourrait être un facteur protecteur contre la MP, mais les interprétations dépendent des études et des cohortes. La consommation modérée mais régulière d'alcool pourrait cependant conduire à une baisse de l'incidence de la MP (Ragonese *et al.*, 2003).

L'activité sportive

Peu d'études ont été menées sur l'activité sportive et l'incidence de la MP. Cependant certaines ont montré qu'une activité sportive modérée à intense pourrait être un facteur protecteur (Thacker *et al.*, 2008).

Les autres a-synucléinopathies

La MP, aussi populaire soit-elle, n'est pas la seule maladie due à des inclusions d'α-syn. D'autres maladies neurodégénératives se caractérisent elles aussi par une accumulation pathologique d'α-syn dans les neurones, les cellules gliales ou les fibres nerveuses. Ce chapitre décrit les deux autres maladies de la famille des α-synucléinopathies : la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée.

La démence à corps de Lewy :

La démence à corps de Lewy (DCL) est une maladie neurodégénérative d'abord définie comme une forme atypique de la MA, puis rattachée aux synucléinopathies lors de la découverte des corps de Lewy. En termes d'incidence, c'est la deuxième maladie diagnostiquée comportant une démence, derrière la MA (Portet *et al.*, 2006). La DCL compte d'ailleurs pour 25% de toutes les démences (Heidebrink, 2002). La prévalence de cette maladie est de 0.7% chez les personnes de plus de 65 ans en France (Portet *et al.*, 2006)).

La DCL se différencie de la MP par l'apparition précoce d'une démence dans la première année de la maladie (Kosaka, 2014). Les signes cliniques de la DCL se cristallisent premièrement autour de la cognition. Les premiers symptômes sont des baisses d'attention, de l'anxiété ou des hallucinations visuelles. Ceux-ci sont suivis d'anosmie, d'aphasie et d'apraxie. Les troubles du sommeil constituent un symptôme majeur de la DCL, ainsi que des troubles de la mémoire immédiate. Viennent aussi les troubles moteurs parkinsoniens classiques mais apparaissant de façon bilatérale et symétriques, contrairement à la MP où les troubles moteurs sont asymétriques. Ces troubles classiques comportent entre autres les troubles de la marche, la rigidité des membres et la bradykinésie. Il est à noter que des troubles du système nerveux autonome sont parfois présents, en particulier des constipations ou une sialorrhée, dus à la perte de cellule intermédiolatérales de la colonne vertébrale (Mayo et Bordelon, 2014).

La DCL se distingue de la MP par la présence de corps de Lewy de façon plus disperse dans le cerveau. En effet, dans la MP, les corps de Lewy se trouvent premièrement dans la SN et le tronc cérébral, tandis que dans la DCL, ils se retrouvent non seulement dans les

noyaux de la substance noire et du tronc cérébral, mais aussi dans le système limbique, le cortex parahippocampique, l'amygdale et le cortex. (Mayo et Bordelon, 2014). La DCL partage aussi quelques ressemblances avec la maladie d'Alzheimer, notamment par la présence de plaques amyloïdes et de neurofibrilles tau-positives (Brooks, 2009).

Les atrophies multisystématisées :

Les atrophies multisystématisées (MSA), sont un ensemble de maladies caractérisées par des inclusions cytoplasmiques oligodendrocytaires d'α-syn appelées inclusions de Papp-Lantos parallèles à des symptômes parkinsoniens et ataxiques.

Les MSA sont divisées en deux groupes en fonction du phénotype moteur : les MSA parkinsoniennes (MSA-P) présentant principalement des atteintes nigrostriées comptent pour 2/3 des cas et les MSA cérébelleuses (MSA-C) présentant des atrophies olivo-ponto-cérébelleuses représentent le tiers restant (Stefanova *et al.*, 2009). L'incidence annuelle des MSA est d'environ 0,6 / 100 000 par ans et la prévalence varie de 1,9 à 4,9 pour 100 000 habitants (Stefanova *et al.*, 2009).

Les MSA affectent les deux sexes de façon équivalente, l'âge moyen de diagnostic est d'environ 60 ans et la durée de survie à partir du diagnostic est de 6 à 10 ans (Goedert *et al.*, 2017). D'un point de vue clinique, deux phénotypes distincts sont retrouvés. Les patients MSA-P présentent de façon prédominante un syndrome parkinsonien composé de bradykinésies, de rigidités, de tremblements et une instabilité posturale. Les patients MSA-C développent un phénotype radicalement différent, présentant une démarche ataxique concomitante à des troubles de la parole, une ataxie des membres et des troubles oculomoteurs (McCann *et al.*, 2014).

Ces maladies sont caractérisées par la présence d'inclusions intracytoplasmiques gliales criblant le cerveau (GCI, glial cytoplasmic inclusion). Comme dans la MP, ces inclusions sont constituées principalement d'α-syn phosphorylée, visible dans la figure 6 (issue de McCann *et al.*, 2014).

Comparaison entre les 3 synucléinopathies

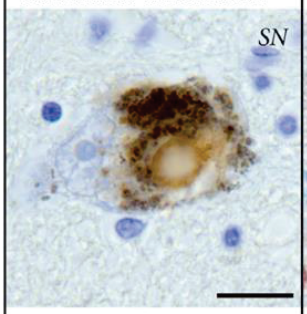
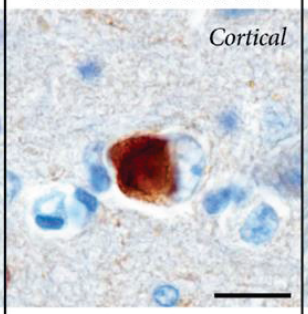
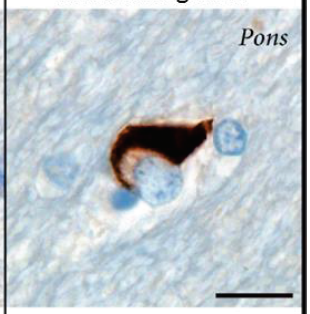
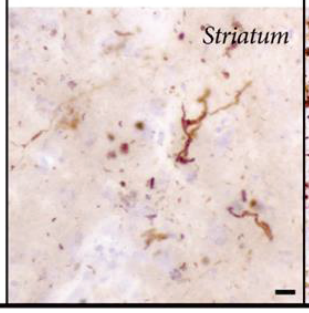
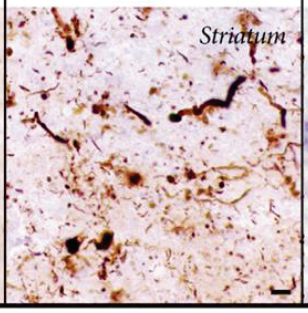
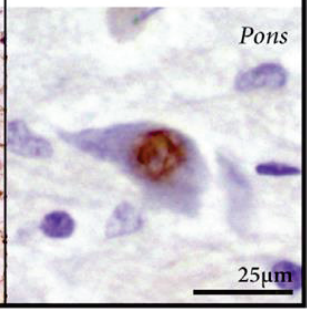
Clinique	Maladie de Parkinson	Démence à corps de Lewy	Atrophie multisystématisée
Age de début (Années)	~60	~70	~60
Durée (Années)	~12	~5	~ 6-9
Présence de signes moteurs	Tous	Certains	Non
Signes non moteurs			
Autonomes	Tardifs	Tardifs	Tôt
Hallucinations	Tardifs	Tôt	-
Défauts d'odorat	Tôt	Tôt	-
Démences	Tardifs	Tôt	-
Synucléinopathies	Inclusions neuronales	Inclusions neuronales	Inclusions gliales
			
	Neurites	Neurites	NNIs
			

Figure 6 : Comparaison entre les 3 synucléinopathies en termes de présentation clinique et d'histopathologie. NNI : Non-neuronal inclusions. Adapté de (McCann *et al.*, 2014)

Les synucléinopathies représentent donc une vaste famille de maladies ayant chacune leurs particularités. Aussi différentes soient-elle, les synucléinopathies sont toutes causées par des accumulations d'α-syn, une protéine neuronale dont les rôles physiologiques précis sont encore assez peu définis. De plus, l'étude de l'implication de cette protéine dans les mécanismes pathologiques de la MP est une voie de recherche prioritaire

II. L'α-synucléine

L'α-synucléine (α-syn) appartient à la famille des synucléines, famille comportant au moins 3 membres (α, β et γ). C'est une protéine ubiquitaire principalement neuronale et essentiellement présynaptique dont le rôle physiologique précis est encore mal défini. L'α-syn est ici notre protéine d'intérêt, cette protéine va donc être détaillée. Son implication dans des maladies neurodégénératives est avérée, c'est d'ailleurs le marqueur histopathologique le plus utilisé pour la MP, mais ses mécanismes de pathogenèse ne sont encore pas ou peu élucidés.

Histoire de l'α-synucléine

La protéine α-syn a initialement été découverte dans le cerveau de raies électriques du Pacifique (*Torpedo californica*) (Maroteaux *et al.*, 1988). Son nom provient de l'observation de sa localisation, **syn**aptique et **nucléa**ire, synucléine. Alors que les corps de Lewy ont été découverts en 1912 par Fritz Heinrich Lewy, le lien entre les corps de Lewy et l'α-syn, composant principal des corps de Lewy, n'a été montré qu'en 1997 par Spillantini et son équipe dans une étude portant sur les corps de Lewy (Spillantini *et al.*, 1997). La même année, l'implication de l'α-syn dans la MP va être découverte par Polymeropoulos lors d'une étude portant sur des cas familiaux de la MP, avec la détection d'une mutation sur le gène SNCA, gène codant l'A-syn, prédisposant les individus d'une même famille au déclenchement précoce d'une pathologie parkinsonienne (Polymeropoulos *et al.*, 1997). En deux décennies, les recherches sur cette protéine se sont précisées, permettant une meilleure compréhension de sa traduction, sa structure, son rôle physiologique et son rôle pathologique.

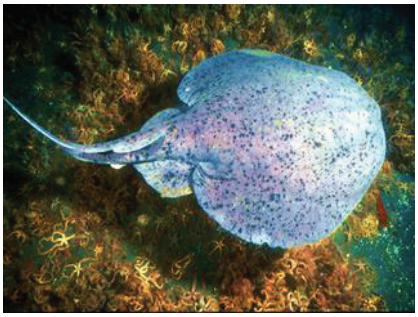


Figure 7 : Raie électrique Torpedo californica. Wikimedia common

Génétique, structure et fonctions de l'a-synucléine

Génétique de l'a-synucléine

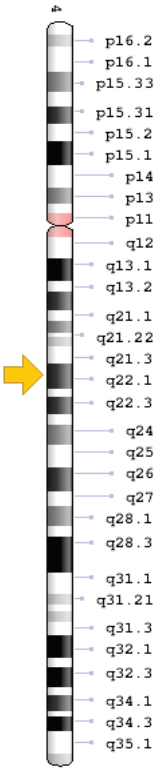


Figure 8 : Représentation schématique du chromosome 4 humain contenant le gène de l'α-syn. La flèche jaune correspond à la localisation du gène SNCA. Image issue du GHR NIH - Genome decoration page

Chez l'homme, l'α-syn est codée par le gène SNCA présent sur le chromosome 4 et chez la souris, il est situé sur le chromosome 6 (Touchman *et al.*, 2001). Ce gène contient 6 exons et possède une taille approximative de 117 kb. Il est exprimé de façon simple par un promoteur similaire aux deux espèces. L'α-syn est composée de 140 acides aminés dont la conservation phylogénétique est particulièrement forte entre les espèces. L'une des caractéristiques principales conservée par l'évolution entre l'homme, le rat, la souris, le poulet et le canari est un domaine amino-terminal (N-terminal) comportant un nombre variable de répétitions de 11 résidus (George, 2002), le domaine carboxy-terminal (C-Terminal) est quant à lui plus variable. Cette séquence consensus particulière de 11 résidus, dont 6 particulièrement conservés (XKTKEGVXXXX), se trouvant du coté N-terminal est unique et non retrouvée dans une autre protéine, elle est répétée de façon imparfaite 7 fois chez l'homme (Dettmer *et al.*, 2015). Ceci forme une hélice α, ayant la particularité d'être amphipathique, c'est-à-dire hydrophile et hydrophobe, permettant à l'α-syn de se lier aux lipides. Cette structure hélicoïdale permet une localisation de la protéine majoritairement aux membranes synaptiques ou membranaires en conditions physiologiques. (Dikiy et Eliezer, 2012).

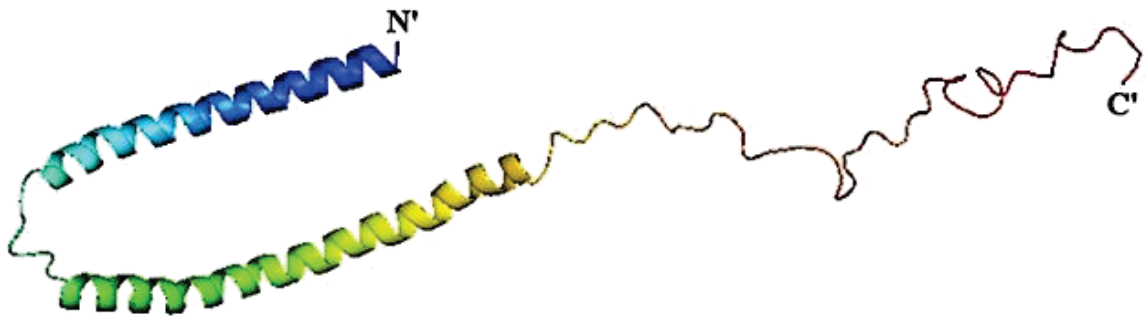


Figure 9 : **Représentation structurale de l'α-syn.** Protéine présentée du coté N terminal (bleu) au côté C-terminal (rouge). Les deux hélices α de l'α-syn sont visibles sur cette représentation. Schéma issu du site internet Protein Data Bank (*https://www.rcsb.org/pdb/ngl/ngl.do?pdbid=1XQ8)*).

Les trois domaines de l'a-synucléine

L'α-syn comporte 3 domaines principaux : Le domaine N-terminal, le domaine « NAC » et le domaine C-terminal, comme indiqué sur la figure 10. Chaque domaine possède ses caractéristiques.

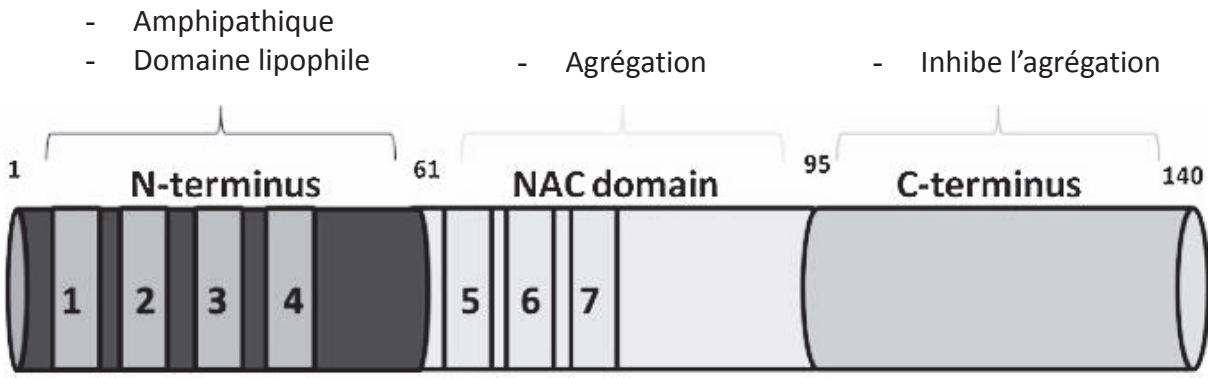


Figure 10: **Représentation schématique des 3 grands domaines de l'α-syn** : Le domaine N-terminal, le domaine NAC (non-amyloid component) et le domaine C-terminal. Les répétitions du domaine KTKEGV conservé phylogénétiquement sont représentées sur ce schéma (Butler *et al.*, 2017).

Le domaine N-terminal (1 - 61) :

Ce domaine comporte la majorité des répétitions de la séquence consensus KTKEGV. Ces séquences sont pour partie retrouvée dans les apolipoprotéines, protéines se liant aux lipides et corps gras pour les transporter dans le système sanguin ou lymphatique. Ainsi le domaine N-terminal adopte la structure hélicoïdale lui permettant de se lier aux micelles ou

aux vésicules de phospholipide. C'est au niveau de ce domaine que la majorité des mutations présentes dans les cas familiaux de la MP sont retrouvées.

Le domaine NAC (62 - 95) :

Ce domaine est lui hydrophobe, il est appelé « Non-Aymoïd-β Component of senile plaques » (NAC) car il correspond au peptide observé dans les plaques amyloïdes observées dans la MA (Ueda 1993). Le domaine NAC est indispensable à l'agrégation de la protéine car son altération ou sa suppression diminue fortement la propension de l'α-syn à s'oligomeriser (Bisaglia *et al.*, 2006; El-Agnaf *et al.*, 1998).

Le domaine C-terminal (96 – 140) :

Contrairement à la partie N-terminale de l'A-syn, ce domaine est plutôt non-structuré et faiblement conservé phylogénétiquement, présentant donc une forte variabilité entre les espèces (Park *et al.*, 2002). Ce domaine est riche en proline et en résidus acides conférant à la protéine une charge fortement négative. Le poids théorique de cette protéine est de 14,6 kDa alors que son poids observé par techniques biochimiques de séparation des protéines est aux alentours de 18 kDa, ceci est expliqué par la forte charge négative du domaine C-terminal. Ce domaine C-terminal pourrait maintenir la structure nativement dépliée de l'α-syn à l'état monomérique par son interaction avec les domaines NAC et N-Terminal (Hong *et al.*, 2011)

Conformations de l'a-synucléine

La conformation native de l'α-syn est encore particulièrement débattue et aucun consensus ne se dégage. Certains décrivent sa structure en monomère natif, d'autres dénoncent l'impossibilité de garder la conformation native de l'α-syn avec les techniques d'analyse en biochimie courantes.

La structure de l'α-syn est donc aléatoire et difficilement prédictible du fait qu'elle n'a pas de conformation définie à l'état natif et soluble. Une étude a montré que l'α-syn purifiée se comporte, *in vitro*, en tant que monomère soluble désordonné (Uversky, 2003). En revanche, *in vivo*, les capacités de l'α-syn à se dimériser ou s'oligomériser rendent l'étude des conformations de cette protéine particulièrement difficile car cette protéine peut s'auto-

oligomériser de façon passive et réversible, ceci a été démontré de façon in-vitro dans plusieurs études où l'incubation à 37°C d'une solution d'α-syn recombinante mène à la formation d'oligomères et de structure d'aspect fibrillaire (Lashuel *et al.*, 2013; Narkiewicz *et al.*, 2014). Ainsi, en conditions physiologiques plusieurs théories s'affrontent sur la conformation la plus représentative de l'α-syn physiologique. Étant données les propriétés multifonctionnelles de l'α-syn, celle-ci peut avoir une flexibilité conformationnelle, ce qui peut permettre à la protéine d'adopter différentes conformations selon la fonction ou la localisation de la protéine (Lashuel *et al.*, 2013).

Monomère natif

La structure de monomère natif désordonné de l'α-syn est celle la plus décrite dans les publications (Coelho-Cerqueira *et al.*, 2013). Depuis le début des études portant sur l'α-syn, vers la fin des années 1990, celle-ci est décrite comme une protéine dont la conformation physiologique est monomérique et désordonnée, elle n'aurait donc pas de structure native définie. (Weinreb *et al.*, 1996).

Dimère - Trimère

Des conformations multimériques de l'α-syn existent sous forme de dimères et de trimères (Cole *et al.*, 2002). Le dimère par exemple aurait une localisation préférentielle au niveau des membranes lipidiques, en effet, une étude à montre in vitro par des techniques de microscopie électroniques que le monomère et le dimère auraient une localisation possible aux membranes lipidiques (Giannakis *et al.*, 2008)

Tétramère

L'hypothèse de l'existence d'une forme tétramèrique de l'α-syn, visible sur la figure 11, dont les techniques d'étude biochimiques traditionnelles auraient raison de sa structure prend de l'ampleur depuis la publication de Bartels et collègues en 2011 (Bartels *et al.*, 2011). Dans cette publication, Bartels présente l'étude de l'α-syn extraite de plusieurs lignées de cellules, crosslinkée au bis(sulphosuccinimidyl) suberate (BS^3) afin de stabiliser *in vivo* les oligomères potentiels puis analysées en conditions non-dénaturantes. Il indique que l'α-syn cellulaire endogène existerait en grande partie sous la forme d'un tétramère de 58 kDa replié en hélice α dans en conditions physiologiques. Du fait de la haute capacité de l'α-syn à se lier aux membranes lipidiques, la conformation monomérique de cette protéine

représenterait une protéine moins fonctionnelle et donc moins abondante en conditions physiologiques.

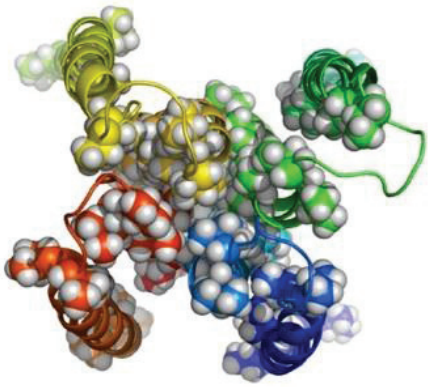


Figure 11 : Proposition de structure tétramèrique de l'α-syn. Tiré de (Paslawski *et al.*, 2016)

Il est aussi spéculé que le tétramère d'α-syn serait plus stable et n'aurait pas la capacité à s'agréger en fibrilles pathologiques. (Bartels *et al.*, 2011; Coelho-Cerqueira *et al.*, 2013). Ainsi, en conditions pathologiques, les tétramères seraient déstabilisés par un facteur héréditaire ou exogène, ce qui mènerait à une conformation oligomérique de l'α-syn, assemblée selon un motif précis sous forme de fibrilles notamment, menant aux agrégats typiques des synucléinopathies. Aussi, les motifs consensus répétés présents dans les domaines N-terminal et NAC participeraient à la tétramérisation physiologique car des une étude a montré que des perturbations dans ces domaines provoquent perte des structures tétramériques au profit de monomères. D'autre part, la perturbation dans les motifs consensus répétés KTKEGV mènent à une rupture de cette tétramérisation, rompant l'homéostasie cellulaire en α-syn et induisant une majorité de formes monomériques. En effet une étude a montré *in vitro* avec une forme recombinante de l'α-syn que des mutations induites dans les motifs KTKEGV mènent à la perte de la forme tétramèrique de la protéine (Dettmer *et al.*, 2015). Ceci provoque une insolubilité de la protéine, des inclusions et une neurotoxicité, ce qui suggère que l'adoption d'une forme en tétramère stable serait indispensable pour l'homéostasie cellulaire physiologique de l'α-syn (Dettmer *et al.*, 2015).

Hypothèse d'équilibre dynamique entre toutes les formes

Des études récentes évoquent l'hypothèse d'un équilibre dynamique entre plusieurs conformations de l'α-syn. Cet équilibre existerait entre le monomère et les formes oligomériques, comme le tétramère par exemple (Mor *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011).

La rupture de cet équilibre pourrait être l'élément initiateur d'une synucléinopathie. Par exemple, une augmentation de la concentration intracellulaire d'α-syn semble favoriser les conformations avec une structure moins hélicoïdale qui, au fil du temps, s'agrègent en formant des oligomères ou des fibrilles (Wang *et al.*, 2011). Ceci montre que la surexpression de l'α-syn induite par des duplications ou triplications du gène de l'α-syn dans les cas familiaux de la MP, prédispose les individus porteurs à développer une synucléinopathie.

Rôle physiologique de l'a-synucléine

Concernant le rôle précis de cette protéine, il est encore mal défini, aucun consensus n'a été trouvé à ce jour. L'α-syn pourrait être impliquée dans la plasticité synaptique, l'apprentissage, le relargage de neurotransmetteurs ou encore le maintien du pool de vésicules synaptiques (Snead et Eliezer, 2014). L'α-syn est retrouvée principalement dans les terminaisons présynaptiques, sa concentration étant relativement faible dans les somas neuronaux et les dendrites. Pour ce qui est de la localisation de cette protéine, elle est abondamment exprimée dans toutes les structures nerveuses, particulièrement dans le cortex, l'hippocampe et la substance noire, et elle représenterait 1% des protéines cytosolique du cerveau (Kim *et al.*, 2014). Elle est aussi retrouvée en dehors du système nerveux, comme le système nerveux périphérique ou dans les globules rouges (Barbour *et al.*, 2008). Les localisations de l'α-syn sont détaillées dans la figure 12.

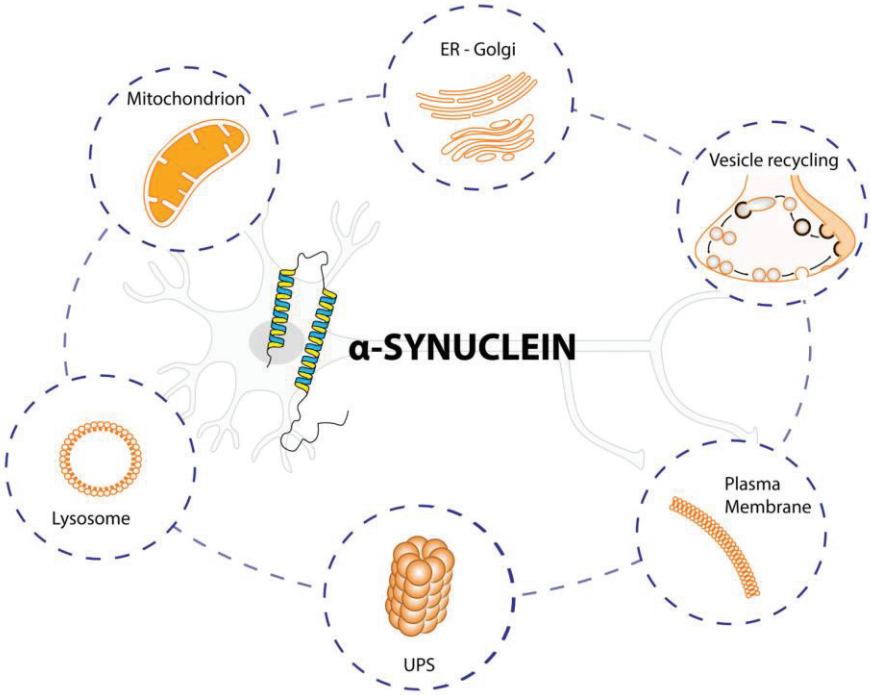


Figure 12 : Cette figure met en avant les localisations intracellulaires de l'α-syn. Cette protéine est présente dans toutes les terminaisons présynaptiques du cerveau, montrant une implication dans le trafic vésiculaire, elle a la capacité de se lier aux membranes, et elle peut être dégradée par le système ubiquitine/protéasome. Les oligomères de l'α-syn pourraient être toxique pour tous les mécanismes cellulaires les plus basiques (fonctions lysosomale, mitochondriales et golgiale). Figure extraite de (Dehay *et al.*, 2015).

Localisation synaptique de l'a-synucléine

L'α-syn est localisée principalement dans les terminaisons nerveuses des neurones matures, comme indiqué par la publication originale de Maroteaux et collègues (Maroteaux *et al.*, 1988). L'expression de cette protéine tant dans le système nerveux central que périphérique sous-tend une fonction générale et non spécifique. L'α-syn est d'abord exprimée au niveau du soma puis est transloquée au niveau de la synapse, particulièrement du coté présynaptique (Galvin *et al.*, 2001; Lykkebo et Jensen, 2002). Cependant, l'α-syn ne participe pas à la formation de la synapse, son rôle réside dans la modulation et la maintenance de celles-ci. Notamment, la gestion des vésicules présynaptiques lors de la transmission du signal semble être un élément important de la fonction de l'α-syn. Ces vésicules ont un rôle particulier car elles stockent divers neurotransmetteurs, elles sont essentielles pour propager les impulsions nerveuses entre les neurones et sont constamment renouvelées par la cellule (Rizzoli et Betz, 2005).

Les interactions membranaires et lipidiques

La localisation présynaptique de l'α-syn et son interaction avec les membranes permettent de suggérer qu'une partie de ses fonctions se situe au niveau membranaire. Cette protéine n'est pas pourvue d'un domaine transmembranaire à proprement dit, seul son domaine N-terminal lui permettrait un ancrage membranaire par son pouvoir hydrophile. Aussi, l'α-syn pourrait se lier au niveau des vésicules synaptiques, sur lesquelles son ancrage direct a été montré *in vivo*. (Gonzalez-Horta, 2015; Maroteaux *et al.*, 1988)

L'α-synucléine et la dopamine

L'α-syn et la dopamine semblent intimement liées du fait de l'implication de l'α-syn dans la physiologie des neurones dopaminergiques (Venda *et al.*, 2010). La tyrosine hydroxylase (TH) convertie la tyrosine en L-DOPA, précurseur de la dopamine après décarboxylation. La TH est donc garante de la concentration en dopamine, et il est montré que la majorité des patients parkinsoniens ont une déplétion de la TH au niveau du mésencéphale (Torack et Morris, 1992; Zhu *et al.*, 2012). Il est montré que l'α-syn régule la synthèse de dopamine par son interaction avec la TH. En effet, l'α-syn inhibe directement la synthèse de dopamine par l'inhibition de l'action de la TH. Aussi, la dopamine peut se fixer directement sur la protéine d'α-syn, au niveau C-terminal, ayant pour effet de limiter la formation de fibrilles pathologiques (Norris *et al.*, 2005).

Activité de protéine chaperon

Les protéines chaperons sont des protéines ayant pour but d'assister d'autres protéines dans leur maturation, évitant ainsi des accrochages non spécifiques menant à des agrégats ou à des repliements pathologiques. Les chaperons empêchent l'agrégation irréversible des protéines et facilite leur repliement tridimensionnel. La protéine 14-3-3 est une protéine régulatrice exprimée dans toutes les cellules eucaryotes ayant plusieurs rôles dont un rôle de chaperon (Fu *et al.*, 2000). L'α-syn partage une homologie de 40% avec la protéine chaperon 14-3-3 indiquant un rôle semblable de chaperon protéique (Ostrerova *et al.*, 1999) De plus, il est montré que cette activité de chaperon est située dans la partie C-terminale, laquelle interagit avec la partie N-terminale de l'α-syn, régulant la solubilité de la protéine et structure (Dedmon *et al.*, 2005).

Pour conclure sur les fonctions de l'α-syn, celles-ci sont générales et non spécifiques à un tissu ou une zone cérébrale. Ainsi le rôle physiologique de l'α-syn n'est pas majeur, car des animaux n'exprimant pas cette protéine n'ont que très peu d'altération et sont parfaitement viables (Specht et Schoepfer, 2001). Ceci indiquerait un ou plusieurs mécanismes de compensation menés notamment par les autres membres de la famille des synucléines, beta et gamma. Des animaux triple-knock out de tous les membres de la famille des synucléines ont une espérance de vie limitée et des défauts neuronaux majeurs (Greten-Harrison *et al.*, 2010).

Les autres synucléines

La β-synucléine

La β-syn est une protéine codée par le gène SNCB. Sa structure est fortement homologue à l'α-syn et elle est elle-aussi exprimée en grande quantité dans le cerveau. Sa localisation semble être présynaptique, comme l'α-syn. Cette protéine est très exprimée dans la substance noire cependant, aucune relation directe avec la maladie de Parkinson n'a été établie pour l'heure. Elle n'est pas retrouvée dans la composition des corps de Lewy, mais elle est associée à la pathologie de l'hippocampe dans la MP et dans la DCL (George, 2002).

La γ-synucléine

La γ-syn a d'abord été détectée dans des études portant sur le cancer du sein, et a été nommée BCSG1 (breast cancer specific gene 1) (Ji *et al.*, 1997). Cette protéine est exprimée dans le système nerveux périphérique (dans les neurones sensoriels primaires, les neurones sympathiques et les motoneurones). Les fonctions précises de cette protéine ne sont pas encore définies (George, 2002).

Même si le rôle ou la fonction précise de l'α-syn n'est pas encore élucidée, plusieurs éléments permettent d'indiquer des familles de fonctions dans lesquelles elle est impliquée. La localisation ubiquitaire et l'implication de cette protéine dans des mécanismes basiques sont donc à prendre en compte dans les pathologies liées à cette protéine. Les synucléinopathies, dont la MP, sont dues à des modifications pathologiques de l'α-syn, ainsi le chapitre suivant s'intéresse au lien entre cette protéine et la MP

III. L'α-synucléine et la maladie de Parkinson

L'α-syn est de nos jours la protéine la plus étroitement liée à la MP. Cependant cette découverte est relativement récente et les mécanismes pathologiques ne sont encore que peu élucidés. Ce chapitre propose des rappels bibliographiques liant l'α-syn, les corps de Lewy et la MP.

Le village italien de Contursi Terme : le « chaînon manquant » entre l'A-syn et la maladie de Parkinson

Le lien entre l'α-syn et la MP a été établi en 1997 par Polymeropoulos et ses collègues, par l'étude du génome de plusieurs familles présentant une forte incidence de la maladie. L'étude de cette famille a permis de mettre en évidence une mutation au niveau du gène SNCA, codant l'α-syn. Ainsi le polymorphisme montré ici est un changement à la position 209 où une guanine est substituée par une adénosine (G209A). Ceci mène à une mutation au niveau de la séquence de la protéine, la mutation Ala53Tyr (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Cette mutation autosomale dominante prédispose à un déclenchement précoce de la MP les porteurs d'une même fratrie. C'est grâce à cette étude que la protéine d'α-syn a été liée clairement à la MP, ouvrant la porte à des milliers d'études sur cette protéine. Depuis, plusieurs autres mutations du gène SNCA, menant à des défauts au niveau de la protéine, ont été identifiées. Ainsi les mutations A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E et A53T ont été identifiées dans des cas familiaux de MP (Kasten et Klein, 2013; Lesage *et al.*, 2013; Rutherford *et al.*, 2014). Il est à noter que ces mutations se situent principalement dans le domaine N-terminal de la protéine, précisément sur les séquences formant les hélices α de l'α-syn.

Les corps et neurites de Lewy

Pathologies présentant des corps et neurites de Lewy

Les inclusions intracytoplasmiques décrites dans la MP se présentent sous deux formes : les corps de Lewy et les neurites de Lewy. Ces corps de Lewy et les neurites de Lewy sont des inclusions intracytoplasmiques présentes dans le système nerveux de plusieurs maladies neurodégénératives telles que la MP (Spillantini *et al.*, 1998) et la démence à corps de Lewy, où les inclusions se situent dans les neurones. Dans les MSA, des inclusions sont présentes dans les cellules gliales, cependant celles-ci ne sont pas structurées comme les corps de Lewy. D'autres pathologie présentent des corps de Lewy comme la MA (Wong et Krainc, 2017), où les corps de Lewy sont détectés dans l'amygdale pour la majorité des cas idiopathiques de la maladie (Chung *et al.*, 2015), la trisomie 21 (Raghavan *et al.*, 1993) ou la maladie de Gaucher (Sardi *et al.*, 2015).

Ces inclusions sont caractéristiques de la MP et représentent le marqueur phare neuropathologique dans le diagnostic histopathologique de la maladie (Shults, 2006b). Dans la MP, deux types de corps de Lewy sont identifiés en fonction de leur localisation :

Les corps de Lewy dans le tronc cérébral

Les corps de Lewy détectés à la base du tronc cérébral sont les plus classiques et majoritaires, ils se retrouvent aussi dans la substance noire. Ils se caractérisent par la présence d'un noyau dense, composé d'un assemblage de protéines, de granules et de vésicules. La couche périphérique du corps de Lewy est moins dense et constitue un halo pâle sphérique encerclant le corps de Lewy. (Brion et Couck, 1995; Hill *et al.*, 1991; Shults, 2006b).

Les corps de Lewy dans le cortex

Les corps de Lewy présents dans le cortex présentent des différences structurelles avec des corps de Lewy classiques présents dans la substance noire et le tronc cérébral. Ils sont beaucoup plus uniformes, sans halo et de forme ronde eux aussi (Brion et Couck, 1995). Les corps de Lewy corticaux sont présents dans la DCL majoritairement (Dickson *et al.*, 1996).

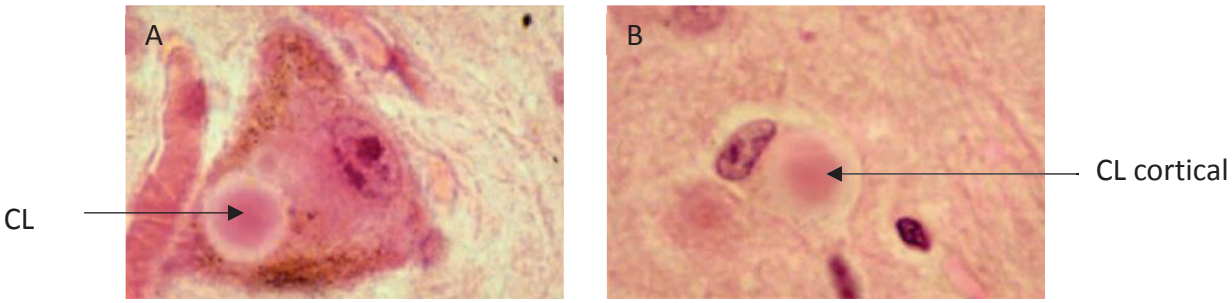


Figure 13 : Différence structurale entre les corps de Lewy vus dans la substance noire et les corps de Lewy corticaux. **A**. corps de Lewy présent dans le tronc cérébral. **B**. corps de Lewy présent dans le cortex d'un patient présentant une maladie à corps de Lewy. CL : Corps de Lewy. Adapté de (Kosaka, 2014).

Une étude souligne la possibilité que les différences vues entre les corps de Lewy du tronc cérébral et les corps de Lewy corticaux puissent être dues à une différence de maturité du corps de Lewy (Roberts *et al.*, 2015). En effet, en lien avec l'initiation de la pathologie de la MP, les corps de Lewy ont une cinétique d'apparition particulière, apparaissant d'abord dans le tronc cérébral et plus tardivement dans le cortex (Braak *et al.*, 2003).

Structure et composition des corps de Lewy

Les corps de Lewy sont éosinophiles, ils apparaissent donc lors d'une coloration classique en hématoxyline/éosine par immunohistochimie et sont repérables grâce à leur centre dense, entouré d'un halo clair, dans les neurones dopaminergiques de patients atteints d'une pathologie parkinsonienne (Arawaka *et al.*, 1998). Une revue recense une liste des toutes les protéines, molécules et organelles identifiées dans ces corps de Lewy :

αβ-Cristalline / **α-Synucléine** / Calcium-calmodulin-dependent protéine kinase II (CaM kinase II) / Calbindine D28K / Chondroïtine sulfate / Chromogranine A / Clusterine-apolipoprotéine J / Cochaperonne C terminus of Hsp-70-interacting protéine (CHIP) / Protéines du complément (C3d, C4d, C7, and C9) / Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) / Cytochrome c / DJ-1 / Dorfine / 14-3-3 protéine / Gelsolin-related amyloid protein Finnish type / Heat-shock protéines 27, 40, 70, 60, 90, and 110 / IκBα Phosphorylée / Lipides / Microtubule-associated protein 2 (MAP-2) / MAP-5/MAP-1b / Mitochondries / Protéinase multi catalytique / MxA protéine / NEDD8 / Neurofilaments / NFκB

/ Omi / HtrA2 / P35nck5a / p62 / séquestosome 1 / Pael-R / ROC1 / Sphingomyéline / Superoxide dismutase 1 (Cu/Zn superoxide dismutase) / Superoxide dismutase 2 (Mn superoxide dismutase) / Synaptic vesicle-specific protein / Synphilin-1 / Synaptophysine / Tau / TorsinA / Tubuline / Tyrosine hydroxylase / **Ubiquitine** / Ubiquitine hydroxylase C-terminale.

Classement par ordre alphabétique, Tiré de Shults CW, 2005

La composition des corps de Lewy est donc variée et met en avant plusieurs familles de protéines. Particulièrement les protéines de la famille « Heat Shock » (HS) sont des protéines chaperon étant présente en réponse à un stress. La famille HS a aussi un rôle important dans les interactions protéines-protéines comme que le repliement protéique ou l'aide à l'établissement d'une conformation protéique appropriée. Ces protéines aident aussi à la prévenir l'agrégation d'autres protéines. L'interaction entre ces protéines et l'α-syn a déjà été démontré (Cox *et al.*, 2016).

Cependant, la principale protéine composant les corps de Lewy est l'α-syn sous sa forme pathologique, phosphorylée en sérine 129 et agrégée, organisée de façon principalement fibrillaire (Shults, 2006a). En effet, les corps de Lewy sont composés à 90% d'α-syn pathologique. Le marquage de l'α-syn est devenu la technique de référence pour le diagnostic post mortem de la MP (Braak *et al.*, 2003; Nagatsu et Sawada, 2007).

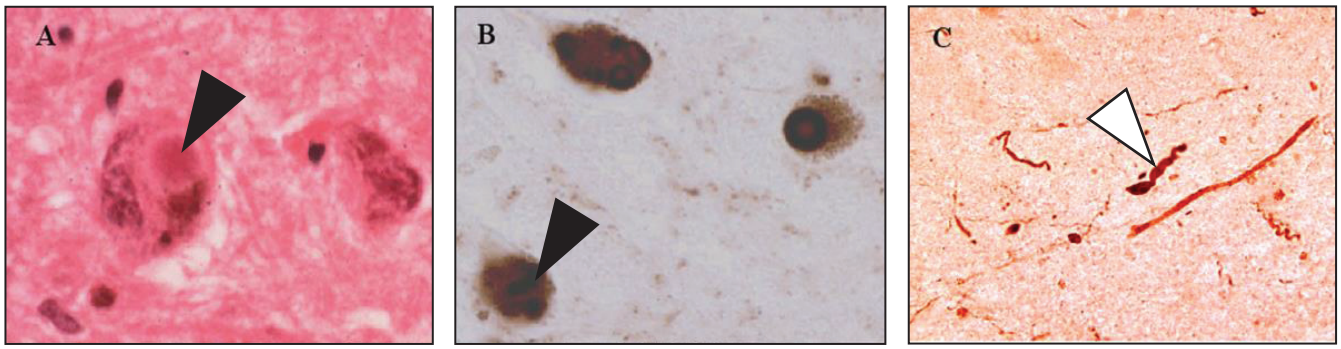


Figure 14 : Corps et neurites de Lewy présents dans les neurones dopaminergiques de la substance noire. **A.** Coloration à l'hématoxyline éosine. **B.** Marquage de ces corps de Lewy par l'α-syn phosphorylée. **C.** Observation de neurites de Lewy marquées par l'α-syn phosphorylée. Les corps de Lewy sont indiqués par des flèches noires et les neurites de Lewy sont indiquées par une flèche blanche.

L'a-synucléine pathologique

Depuis deux décennies, en lien avec les travaux de Polymeropoulos, les recherches concernant la MP se sont concentrées sur l'étude de l'α-syn et de ses différentes formes au sein de la cellule (Polymeropoulos *et al.*, 1997).

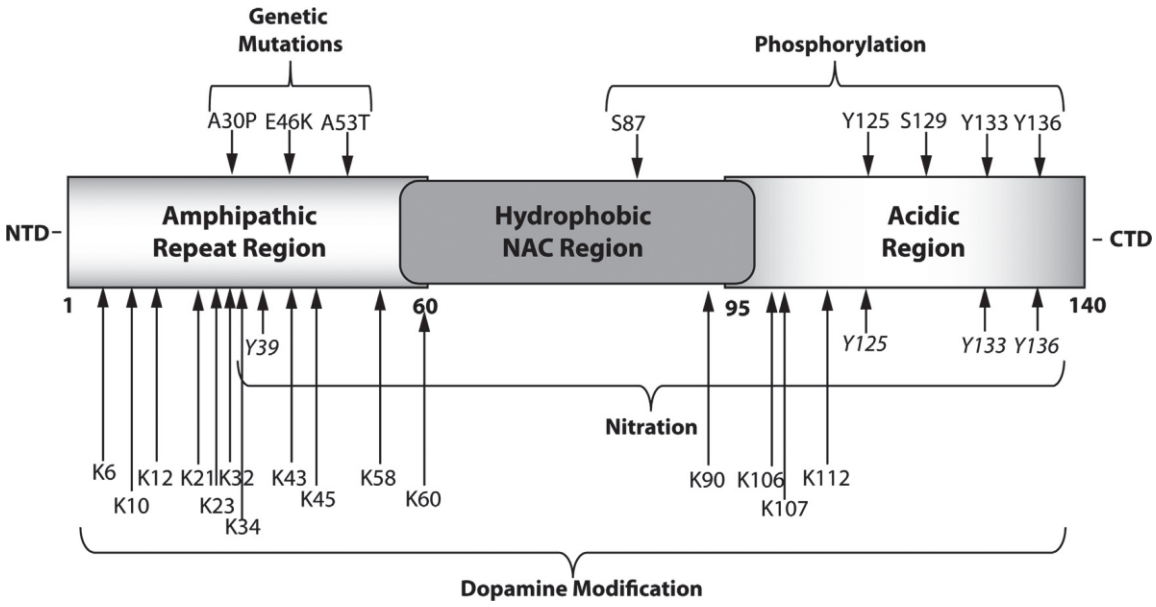


Figure 15 : Modifications génétiques ou post-traductionnelles possibles sur l'α-syn. Tiré de (Barrett et Timothy Greenamyre, 2015).

Les gènes liés au parkinsonisme

La quasi-totalité des cas de MP sont sporadiques et leur âge moyen de diagnostic de la maladie est de 62 ans (Kempster *et al.*, 2010), cet âge varie selon les études mais ce diagnostic se fait la plupart du temps après 60 ans. Alors que les formes sporadiques comptent pour environ 85% des cas, les formes familiales représenteraient un faible pourcentage, approximativement 15%, et sont toutes liés à des défauts génétiques (Vibha *et al.*, 2010).

Les loci PARK et la MP

Les formes familiales dues à des perturbations monogéniques peuvent atteindre plusieurs gènes, ces gènes sont indiqués sur le tableau 1. Les atteintes au niveau des gènes *SNCA, PRKN, PINK-1, DJ-1* et *LRRK2* ont été identifié comme étant une base possible de pathologies liées à la MP. Ces formes monogéniques de la MP atteignent 5 à 15% des cas

totaux et présentent pour la plupart un âge d'apparition de la maladie plus jeune que les formes sporadiques. (Shulman *et al.*, 2011). Ces formes génétiques sont généralement plus agressives que les formes sporadiques, leur phénotype étant sensiblement le même que les cas sporadiques mais l'évolution de la maladie est plus rapide est plus prononcée (Baba *et al.*, 2006). Concernant le gène SNCA, les modifications génétiques se présentent sous plusieurs formes : soit sous la forme de mutations ponctuelles, soit des duplications ou triplications du locus entier du gène sur le chromosome.

Tableau 1 : Principaux gènes liés à la MP. Adapté de (Pankratz et Foroud, 2007)

Nom du Locus	*Nom du gène*	*Protéine produite*	*Hérédité*	*Rareté*
PARK 1/4	*SNCA*	α-synucléine	Dominant	Rare
PARK 2	*PRKN*	Parkin	Récessif	50 % des cas précoces récessifs
PARK 6	*PINK-1*	PTEN induced putative kinase 1	Récessif	7 % des cas précoces récessifs
PARK 7	*DJ-1*	DJ-1	Récessif	Rare
PARK8	*LRRK2*	Leucine-rich repeat kinase 2	Domiant	2%

Les mutations du gène SNCA

Le gène SNCA a été le premier gène lié à des mutations menant à une forme autosomale dominante de la MP (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Comme cité précédemment la mutation A53T a été le premier polymorphisme du gène identifié dans des cas familiaux de la MP. Les patients présentant des mutations sur ce gène ont un âge d'apparition de la maladie plus précoce, une progression rapide et une propension à développer des démences ou des déclins cognitifs (Gasser, 2009; Papapetropoulos *et al.*, 2003).

Au moins six mutations ont été identifiées sur ce gène, menant à des mutations délétères sur la protéine : les mutations A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E et A53T (Appel-Cresswell *et al.*, 2013; Dehay *et al.*, 2015) Figure 16. Ces mutations sont rares et ne compteraient que pour 1 à 2 % des cas totaux de la MP. (Klein et Schlossmacher, 2006). Chacune d'entre elle a été identifiée dans une famille portant une mutation prédisposant à la MP (Armitage et Roffwarg, 1992; Athanassiadou *et al.*, 1999; Ki *et al.*, 2007; Puschmann *et al.*, 2009)

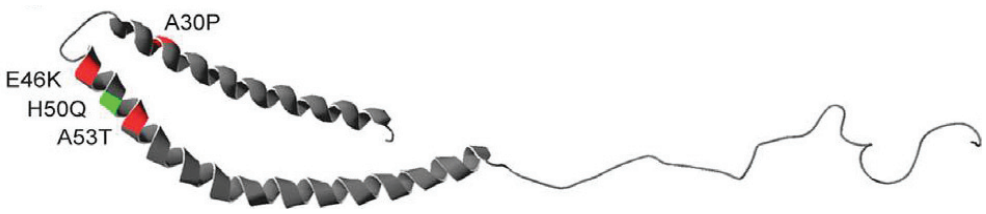


Figure 16 : Représentation de la protéine α-syn mettant en exergue les mutations A30P, E46K, H50Q et A53T. Il est à noter que la mutation A30P se situe sur une hélice α différente de celle dans laquelle sont localisés les mutations E46K, H50Q et A53T. Ceci pourrait montrer un mécanisme pathologique commun pour ces mutations. Extrait de (Appel-Cresswell *et al.*, 2013)

Les mutations identifiées ici sur l'α-syn sont localisées exclusivement dans le domaine N-terminal de la protéine. Ce domaine N-terminal de l'α-syn lui permet de se fixer aux membranes lipidiques et d'adopter une structure secondaire en hélices α. Ces mutations empêcheraient donc pour partie ces ancrages membranaires, la protéine aurait ainsi une propension plus forte à adopter une structure en feuillets beta, favorisant l'agrégation de la protéine en oligomères. Ceci entraînerait donc un gain de fonction toxique pouvant être mis en relation avec la pathogenèse de la MP.

Le gain de fonction évoqué dans le paragraphe précédent est propre à chaque mutation. Par exemple, alors que la mutation A30P mène à un phénotype parkinsonien classique apparenté aux phénotypes idiopathiques avec un âge d'apparition des symptômes « tardif », les autres mutations sont caractérisées par une forme de la maladie atypique, plus agressives et comprenant des hallucinations, des démences, et des troubles du système nerveux autonome (Lesage *et al.*, 2013; Pasanen *et al.*, 2014; Polymeropoulos *et al.*, 1997).

Les duplications ou triplications du gène SNCA

L'autre défaut génétique vu dans les cas familiaux de la MP liés à la MP sont des duplications (Chartier-Harlin *et al.*, 2004) et triplications (Olgiati *et al.*, 2015) du gène *SNCA*. Ces multiplications du gène ont été identifiées par des études génomiques dans des familles présentant une incidence forte et précoce de la MP. De façon intéressante, il semblerait que la gravité des symptômes soit liée au nombre de copies du gène présents chez l'individu. Ainsi, un nombre accru de copies du gène SNCA (triplications > duplications), mène à un phénotype de la MP plus sévère, lié à une progression plus rapide (Ross *et al.*, 2008). Ceci indiquerait que la concentration intracellulaire en α-syn serait intimement liée à la gravité de la maladie.

Modifications post traductionnelles de l'α-synucléine

L'α-syn peut présenter une multitude de modifications post-traductionnelles. Ces modifications comprennent : la phosphorylation, l'oxydation, l'ubiquitination, la nitration, la sumoylation, la glycosylation ou l'acétylation. Il a été montré que ces modifications post traductionnelles influencent le comportement de l'α-syn dans la cellule, notamment l'oligomérisation, l'agrégation ou la pathogénicité, mais la contribution précise de ces différentes modifications dans l'initiation de la MP n'est toujours pas clairement définie. Étonnamment, la majorité de ces modifications se retrouve dans la partie C-terminale de la protéine, comme il est vu sur la figure 17.

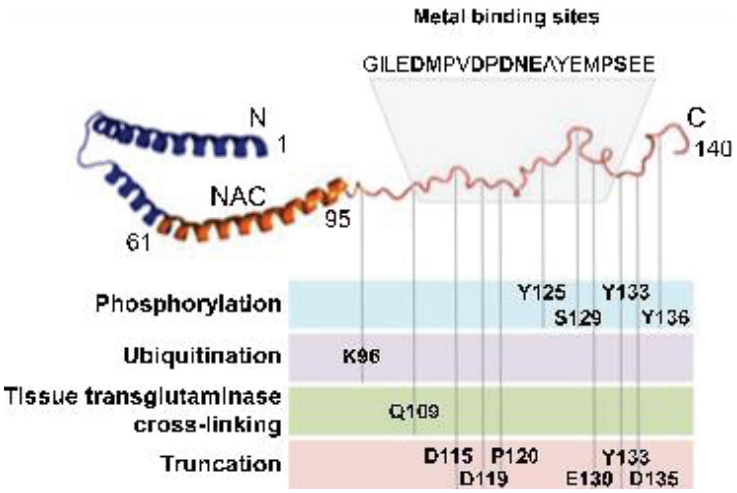


Figure 17 : Précision sur la localisation des modifications post-traductionnelles vues sur la protéine d'α-syn. Tiré de (Oueslati, 2016)

Phosphorylation en sérine 129

La phosphorylation en sérine 129 (S129) de l'α-syn est reconnue comme étant le marqueur majeur de la MP (Fujiwara *et al.*, 2002). Cependant, en conditions physiologiques, environ 4% de la quantité totale de la protéine se présente sous forme phosphorylée (Muntane *et al.*, 2012), ceci régulant des fonctions propres à la protéine. La phosphorylation S129 étant majoritaire, seule celle-ci sera développée dans ce document.

Qui phosphoryle l'α-syn ?

La phosphorylation de l'α-syn sur le résidu S129 est assurée par plusieurs kinases. Une étude *in-vivo* a montré que les caséines kinases 1 et 2 (CK1 / CK2) ont la capacité de phosphoryler l'α-syn (Waxman et Giasson, 2008). Au niveau des membranes (cellulaires, synaptiques ou vésiculaires), l'α-syn peut être phosphorylée par la kinase des récepteurs couplés à la protéine G (GRKs) (Hara *et al.*, 2013). La Polo kinase 2 (PLK2) aurait aussi la capacité de phosphoryler l'α-syn (Inglis *et al.*, 2009).

La forme phosphorylée S129 en conditions physiologiques

En conditions physiologiques, la phosphorylation S129 de l'α-syn aurait un rôle dans la régulation de son ancrage membranaire. En effet, des études ont montré que le blocage de la phosphorylation l'α-syn par une mutation au niveau de la sérine 129 augmente la quantité de protéine liée à la membrane (Azeredo da Silveira *et al.*, 2009; Fiske *et al.*, 2011). Cette mutation aurait donc un rôle inhibiteur dans l'ancrage de la protéine aux membranes. Par extension de ce rôle dans l'inhibition de l'ancrage membranaire, le rôle physiologique de l'α-syn dans la régulation des neurotransmetteurs pourrait être modulé par la phosphorylation S129, laquelle pourrait être phosphorylée par une kinase (kinase des récepteurs couplés à la protéine G). Ceci pourrait participer à la régulation des neurotransmetteurs, notamment la dopamine, par cette inhibition spécifique (Hara *et al.*, 2013; Muntane *et al.*, 2012).

La phosphorylation S129 aurait aussi un lien avec la régulation de la concentration cellulaire de la protéine. Plusieurs modifications post traductionnelles ont été montrées comme impliquées dans la dégradation de la protéine, mais peu de recherches ont été menées sur le résidu S129. Cependant des équipes ont déjà montré in-vivo que l'état de phosphorylation de l'α-syn sur ce résidu peut réguler la capacité des cellules à éliminer les oligomères (Tenreiro *et al.*, 2014). Ceci pourrait être un élément important dans la transition d'un état physiologique à l'état pathologique, menant à la rupture de l'équilibre intracellulaire de l'α-syn.

Phosphorylation et apparition des inclusions de Lewy

La phosphorylation en S129 de l'α-syn jouerait un rôle majeur rôle dans l'apparition des inclusions pathologiques présentes dans la MP. Par exemple, dans un modèle de drosophile, la mutation du résidu sérine 129 en alanine prévient la phosphorylation S129 et protège contre la perte de neurones dopaminergiques (Chen et Feany, 2005). Aussi, le blocage de cette phosphorylation induit une baisse de la formation des agrégats. Ces résultats suggèrent que la séquestration de l'α-syn insolubles dans des corps de Lewy pourrait être un mécanisme protecteur émanant des cellules contre la neurotoxicité induite par ces corps d'inclusion. L'α-syn non phosphorylée présente physiologiquement est recrutée par les inclusions intracytoplasmiques, tandis que la phosphorylation de l'α-syn favoriserait l'entretien de cette conformation sous une forme toxique soluble. Cependant, une étude a montré *in vitro* par culture cellulaire que la phosphorylation S129 n'est pas nécessaire à la formation de fibrille (Luk *et al.*, 2009). Selon cette configuration, les mutations familiales héréditaires prédisposant à la MP auraient tendance à augmenter les niveaux d'α-syn phosphorylée en S129, soit par l'augmentation des niveaux de synucléine totale avec les duplications ou triplication du locus du gène, soit par les mutations ponctuelles qui, par des mécanismes indirects de changement de la conformation de la protéine, induiraient cette phosphorylation. Ceci suggérerait que la phosphorylation de la protéine ne serait pas la cause de l'agrégation en inclusions de Lewy mais que la séquestration de la protéine dans ces inclusions serait un mécanisme protecteur destiné à éviter la propagation des formes neurotoxiques de l'α-syn.

Activation de la voie UPR

Les mécanismes de toxicité de l'α-syn pourraient être liés à la voie UPR (Unfolded Protein Response). La voie UPR est une réponse de la cellule suite à un stress cellulaire impliquant le réticulum endoplasmique. Cette voie est activée lorsque qu'il se produit l'accumulation d'une protéine mal repliée à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Ainsi cette voie permet d'engager plusieurs mécanismes de protection cellulaire tels que l'activation de la production de protéines chaperons et la dégradation de la protéine mal-repliée. En dernier recours, si ces mécanismes ne parviennent pas à régler l'anomalie protéique présente dans la cellule, la voie UPR va enclencher un processus d'apoptose. Cette

voie UPR est donc décrite comme un arsenal de défense provenant de la cellule contre les défauts de repliement protéique (Varma et Sen, 2015).

En effet, l'α-syn mal repliée joue un rôle central dans la dégénération neuronale dans la MP et il est montré que la surexpression de formes mutantes de l'α-syn peut être la source d'une cascade de défauts impliquant la machinerie cellulaire (Kurz *et al.*, 2010). L'activation de la voie UPR pourrait être une fonction neuroprotectrice enclenchée par la cellule pour éliminer ces formes pathologiques de l'α-syn. Cependant, avec l'activation prolongée de l'UPR, suite à un stress génétique ou environnemental, la cellule est submergée de signaux d'activation de la voie UPR et induit l'apoptose. Une étude montre clairement que l'activation *in vitro* de la voie UPR est dépendante de la présence de la phosphorylation S129 de l'α-syn (Sugeno *et al.*, 2008). Une autre étude *in vitro*, a permis de lier l'accumulation de l'α-syn intracellulaire avec l'activation de la voie UPR, indiquant que l'hypothèse de la neurodégénérescence vue dans la MP pourrait être liée à cette voie (Bellucci *et al.*, 2011).

Les autres modifications post-traductionnelles

Oxydation/Nitration

Les neurones dopaminergiques présents dans la SN de certains patients sont soumis à un stress oxydatif important (Chavarria et Souza, 2013; Floor et Wetzel, 1998). L'effet du stress oxydatif sur ces neurones est l'apparition d'une modification post traductionnelle particulière de l'α-syn : la nitration. Peu d'études portent sur cette modification, en attestent les 66 résultats pour la recherche « alpha synuclein nitration » sur Pubmed en septembre 2017, mais son implication dans les pathologies parkinsoniennes semble être importante. Notamment, une étude a montré que la nitration d'une tyrosine sur l'α-syn permet de former un dimère ou des oligomères très stables par crosslinking de dityrosine. (Souza *et al.*, 2000). Ceci serait un mécanisme protecteur pour la cellule, permettant de maintenir des petits oligomères stables et empêchant la formation de fibrilles (Yamin *et al.*, 2003). Cependant, lors d'un stress oxydatif trop important, ce mécanisme protecteur deviendrait délétère et intègre les formes nitrées de l'α-syn aux fibrilles.

Ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post traductionnelle induisant une cascade biologique servant à adresser une protéine vers le protéasome afin qu'elle soit dégradée. Ceci se traduit par la liaison réversible d'une ou plusieurs petites protéines ubiquitine de 8 kDa sur les sites d'ubiquitination protéique, les résidus lysines. Un élément intéressant est que le second composant principal des corps de Lewy est l'ubiquitine, indiquant un fort taux d'ubiquitination de l'α-syn pathologique. L'α-syn comporte 15 lysines, donc 15 sites potentiels d'ubiquitination. Des études ont montré que les sites d'ubiquitination majoritaires sont les résidus K6, K10 et K12, aussi situés dans la partie N-Terminale de la protéine (Nonaka *et al.*, 2005). L'ubiquitination de la protéine impacte la localisation de celle-ci et les processus de dégradation de l'α-syn, cette modification post traductionnelle jouerait donc aussi un rôle dans la pathogenèse de la MP, comme il est vu dans la figure 18.

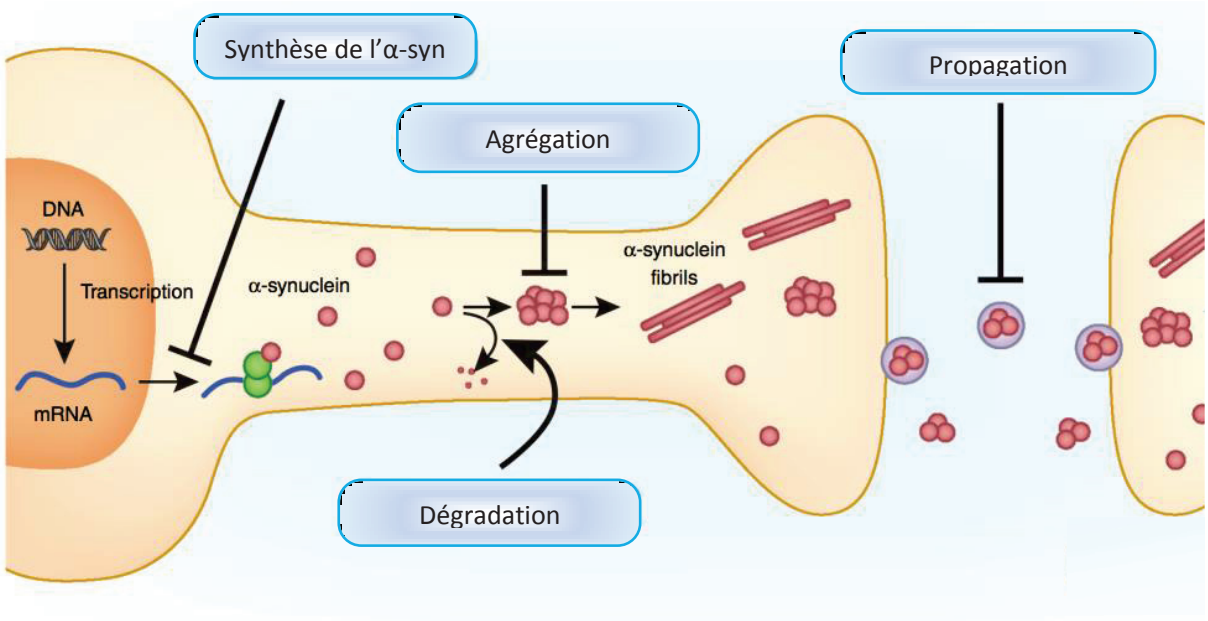


Figure 18 : Schéma de la pathogénie de l'α-syn depuis sa transcription jusqu'à sa propagation à une cellule voisine. Adapté de (Wong et Krainc, 2017).

Modification de l'homéostasie d'α-synucléine

La synthèse et la dégradation de l'α-syn sont des mécanismes continus et physiologiques au sein d'un individu sain. Cet équilibre est régi par les mécanismes cellulaires de synthèse de la protéine, la transcription/traduction, et les mécanismes d'élimination de la protéine tels que l'autophagie ou l'adressage au protéasome. L'augmentation de la concentration

intracellulaire de la protéine favorise la formation et l'accumulation d'oligomères ou de fibrille d'α-syn, toxique pour la cellule (Cookson, 2009). La rupture de cet équilibre peut être causée par différents facteurs. Les facteurs endogènes, comme par exemple les mutations sur le gène SNCA ou les duplications/triplications du même gène, sont associés la pathogenèse moléculaire vue chez les patients parkinsoniens. Aussi, les facteurs exogènes, comme par exemple l'exposition à un neurotoxique tel qu'un pesticide, ont des mécanismes d'action encore peu élucidés en termes d'augmentation de niveau d'α-syn. Certaines études ont montré *in vivo* que l'exposition à un pesticide peut augmenter spécifiquement les niveaux d'α-syn endogènes dans différentes lignées cellulaires (Chorfa *et al.*, 2013). Au niveau des systèmes nerveux périphérique, il a été montré qu'un neurotoxique peut entrainer l'augmentation des niveaux d'α-syn, particulièrement dans le système nerveux entérique (Pan-Montojo *et al.*, 2012).

Les facteurs liés à la rupture de l'équilibre entre les conformations de l'α-syn sont multiples et sont, pour la plupart, liés épidémiologiquement au déclenchement de la MP (Figure 20). Parmis ces facteurs il est retrouvé des mutations ou multiplications du gène SCNA, de la toxicité cellulaire due à une stress oxydatif ou des dysfonctions cellulaires (dégradation, réticulum endoplasmique), des modifications post-traductionnelles, ou alors l'exposition a des facteurs environnementaux tels que les pesticides. Une des étapes clé des pathologies liées à l'α-syn réside dans le changement de conformation de l'α-syn appelé « transconformation » et menant à la formation de fibrilles.

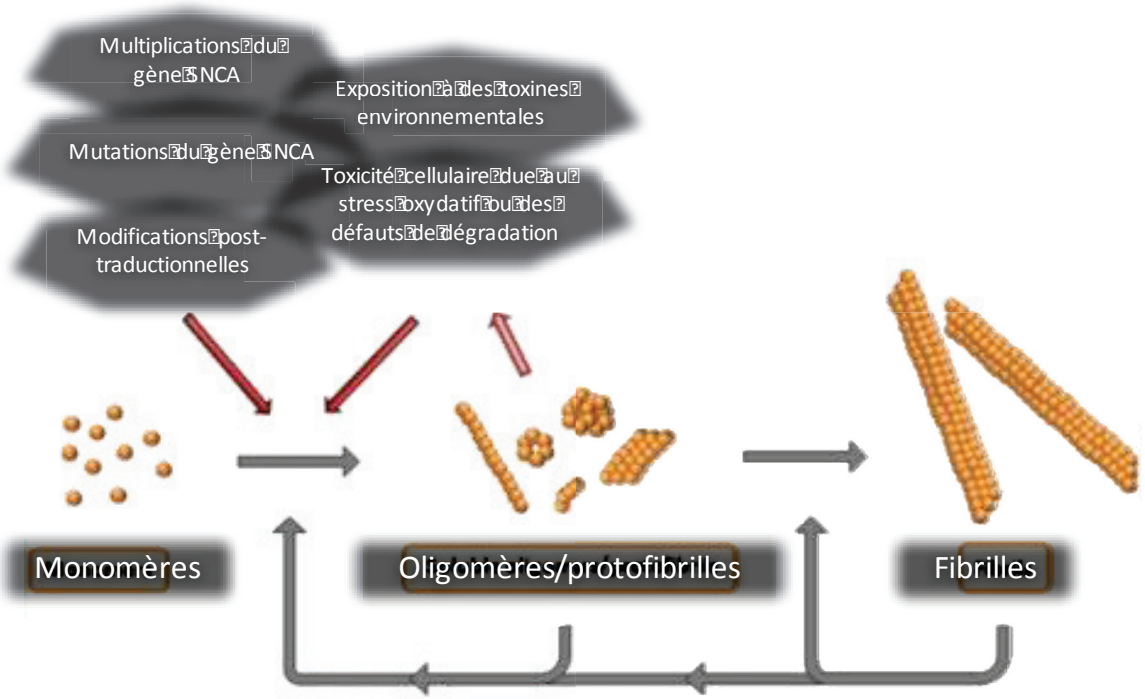


Figure 19 : Mécanismes menant à la formation d'oligomères pathologiques de l'α-syn. Adapté de (Ingelsson, 2016)

La transconformation de l'a-syn – Le « misfolding »

L'une des étapes clé dans la transition entre la forme physiologique à une forme possiblement pathologique de l'α-syn, réside dans un changement de structure de la protéine. L'α-syn physiologique possède une conformation hélicoïdale comportant deux hélices α au niveau de son domaine N terminal, particulièrement lors de sa fixation aux membranes. Lorsque celle-ci s'agrège, elle perd sa conformation en hélice α au profit d'une forme plus propice à l'oligomérisation : la conformation en feuillet beta (Vilar *et al.*, 2008).

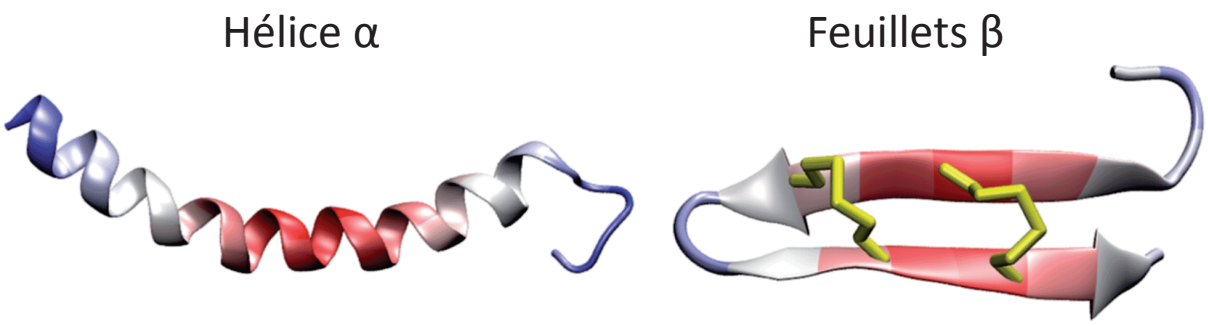


Figure 20 : Schéma de la modification de structure de l'α-syn. **A**. Structure en hélice α. **B**. Structure en feuillets béta. Tiré de (Zhang *et al.*, 2014).

Les corps et neurites de Lewy sont composés de filaments d'environ 10 nm de large, composés exclusivement d'α-syn agrégée passivement par l'affinité particulière que possède les feuillets beta entre-eux (Breydo *et al.*, 2012; Spillantini *et al.*, 1998). Le changement de conformation depuis l'hélice α vers le feuillet β est appelé « transconformation » et est visible sur la figure 20. Cette transconformation peut être liée à des mutations génétiques, étant donné que la majorité des mutations retrouvées dans les formes familiales de la MP se situent sur les hélices α, changeant structurellement la protéine. Il a été proposé que les mutations A53T, A30P et E46K accélèrent l'agrégation par ce mécanisme (Conway *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Ceci semble majoritairement vrai pour les mutations A53T et E46K, alors que la mutation A30P, présente sur une hélice α différente, ralentie l'oligomérisation. (Giasson *et al.*, 1999).

Formation d'oligoméres et de protofibriles

La transconformation de l'α-syn mène à la création d'oligomères solubles d'α-syn ayant des caractéristiques propres. Ces oligomères, aussi appelés protofibrilles, ont une forme annulaire ou de ficelles lors d'une observation au microscope. Un article recensant les étapes de la formation *in vivo* de fibrilles détaille, structure par structure, des iconographies de chaque stade, proposant une séquence dans la création de formes pathologiques d'α-syn, comme il est vu sur la figure 21. (Zhang *et al.*, 2013).

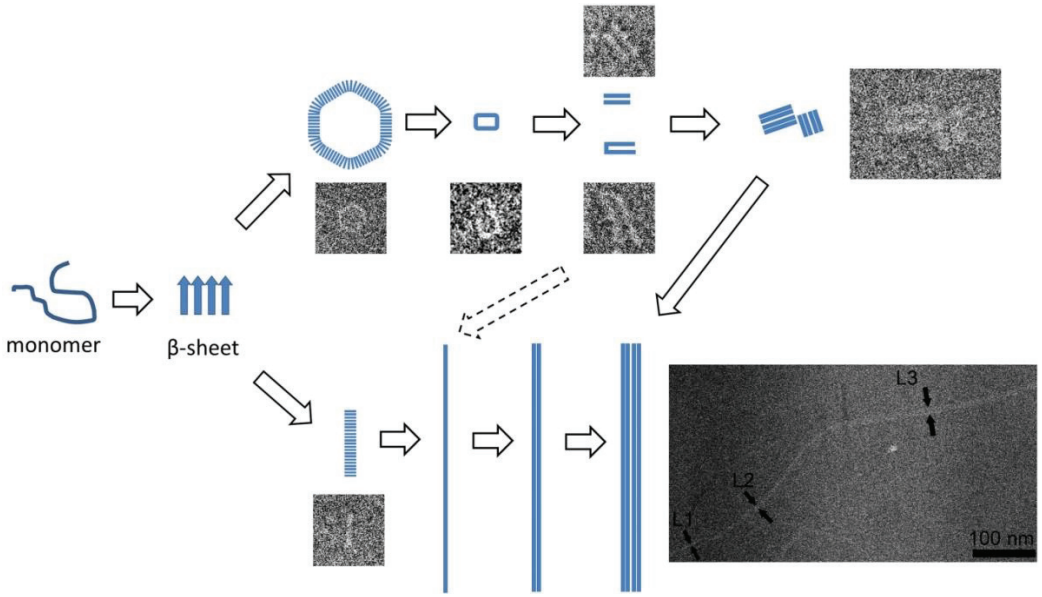


Figure 21 : Depuis le monomère de l'α-syn jusqu'aux fibrilles. Proposition d'assemblage pathologique du monomère soluble en fibrilles pathologiques (Zhang *et al.*, 2013).

Ainsi dans les premiers stades pathogéniques, le monomère soluble non structuré d'α-syn prendrait une conformation en feuillet bêta, ayant une plus grande tendance à s'auto agréger. Ces monomères d'α-syn s'assemblent et s'agrège ainsi en petits oligomères en forme de bâtonnets. Ces structures particulières sont appelées protofibrilles et ceux-ci deviennent progressivement insolubles au fur et à mesure de leur développement. Ces protofibrilles recrutent ensuite d'autres monomères solubles et forment des protofibrilles sphéroïdes ou des protofilaments par des mécanismes passif, la démonstration *in vitro* de ce mécanisme a été faite à partir te protofibrilles ajoutées dans des cultures de neurones hippocampiques. Les protofilaments vont ensuite mâturer et former des fibrilles matures caractéristiques des inclusions intracytoplasmiques présentes dans la MP. Ces fibrilles sont de type amyloïde et sont à la base de la formation des corps de Lewy et des neurites de Lewy caractéristiques des synucléinopathies.

La diffusion de l'a-syn – « *spreading* »

Une confusion permanente existe dans les études : (1) l'α-syn est une protéine «baladeuse» dont les mécanismes de migration n'auraient pas de rapport avec un mécanisme de type prion, (2) Des mécanismes de type prion, dits « prion-like » pourraient exister pour la diffusion de l'α-syn, impliquant la transmission de la protéine pathologique de proche en proche, mécanisme appelé le « seeding ». Cependant, là encore aucun consensus n'existe concernant ces mécanismes.

En lien avec la théorie de Braak (développée dans le chapitre suivant), l'α-syn aurait la capacité de migrer le long du réseau nerveux des individus atteints. Plusieurs expériences in-vivo ou in-vitro ont permis de mettre en évidence les capacités migratoires de l'α-syn, mais aussi, le caractère prion-like, de cellule à cellule.

Pour ce qui est du mécanisme prion-like, à la fin des années 2000, des équipes ont montré que des neurones embryonnaires greffés dans le mésencéphale de patients parkinsoniens présentent, après le décès de ceux-ci des années après la greffe, des inclusions intracytoplasmiques telles que des corps de Lewy (Kordower *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Ceci suggère la transmission de la protéine α-syn pathologique depuis l'hôte vers la cellule greffée. Cela a intrigué les chercheurs et a lancé les premières théories de

propagation de l'α-syn désignées comme « prion-like » pour décrire les mécanismes pathogènes de cette protéine, mécanisme présenté dans la figure 22. Dans ce cas, l'α-syn aurait la possibilité d'être relarguée dans le milieu extra cellulaire par processus actif comme l'exocytose, ou lors de la mort de la cellule (induite par divers moyens comme l'activation de la voie UPR), le matériel intracellulaire se déversant dans le milieu environnant. Cette α-syn pathologique relarguée dans la matrice cellulaire pourrait être captée par les cellules environnantes par différents mécanismes comme l'endocytose, profitant de la capacité de l'α-syn à se lier aux membranes. Ainsi, une fois transloquée dans la cellule voisine, l'α-syn pourrait exercer une toxicité et agir comme « graine » (seeding) induisant l'oligomérisation puis le développement de corps de Lewy (Brundin *et al.*, 2008). Dans des modèles in-vitro, des équipes ont montré la possibilité de la sécrétion de l'α-syn dans le milieu de culture puis l'absorption de ces protéines par des cellules voisines, montrant la possibilité de propagation de l'α-syn de cellule à cellule (Hansen *et al.*, 2011).

La migration de l'α-syn le long des réseaux neuronaux a aussi été montrée par plusieurs équipes. Notamment, dans le modèle C57Bl/6, une étude montre que l'injection stéréotaxique de différentes formes d'α-syn marquée (monomérique, oligomérique et fibrille) dans les bulbes olfactifs mène à une diffusion de cette protéine dans les structures interconnectées à ces bulbes (Rey *et al.*, 2013). Aussi, cet article montre que seules les formes mono et oligomériques ont la capacité de migrer dans le cerveau, les fibrilles étant peu mobiles. Cette migration d'α-syn ne se cantonne pas au système nerveux central, une étude a montré que, suivant l'injection dans la muqueuse intestinale de rats Wistar d'α-syn monomérique ou de lysat de cerveau de patient parkinsonien, l'α-syn peut diffuser le long du nerf vague pour se retrouver jusqu'au DMV. Cette propagation antérograde le long du système nerveux montre donc une diffusion directe depuis l'intestin jusqu'au cerveau (Holmqvist *et al.*, 2014). L'α-syn possède donc la capacité de migrer le long des voies nerveuses, dans le SNC que dans le SNE.

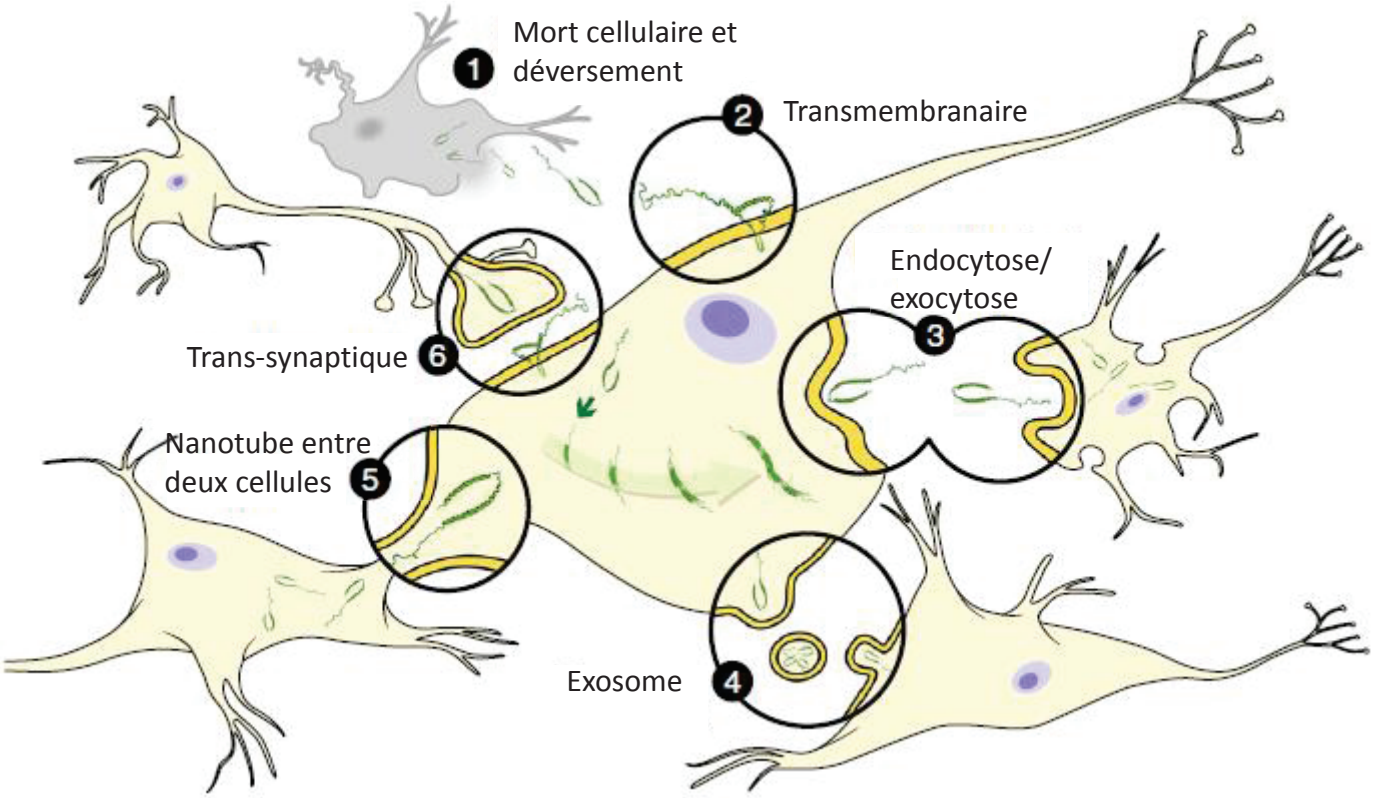


Figure 22 : Détail de 6 mécanismes possibles de diffusion de l'α-syn de cellule à cellule. **1**. Par mort cellulaire et déversement du contenu cytoplasmique dans la matrice intracellulaire. **2**. De façon transmembranaire. **3**. Par des mécanismes d'endocytose/exocytose. **4**. Par bourgeonnement exosomal contenant des protéines d'α-syn. **5**. Par des connections entre 2 cellules appelées « nanotube ». **6**. Diffusion de manière trans-synaptique. Adapté de (Visanji *et al.*, 2013)

Ainsi, les mécanismes de pathogenèse cellulaire et moléculaire de l'α-syn commencent à être élucidés. Depuis des défauts présents sur le gène, ou par l'exposition à des facteurs environnementaux, jusqu'à la création de fibrilles pathologiques menant à des inclusions intracytoplasmiques, la cinétique d'apparition des corps d'inclusion commence à se dévoiler. La compréhension des mécanismes pathogéniques précis de la MP ou des autres synucléinopathies reste encore à être comprise complètement.

Une fois créés, ces corps et neurites de Lewy ne seraient pas figés dans la cellule. Au contraire, une évolution de la diffusion de ceux-ci prendrait place suite à l'apparition de la pathologie (Braak *et al.*, 2003).

IV. Les théories d'initiation de la maladie de Parkinson

Plusieurs scientifiques ont montré leurs positions claires sur leurs interprétations de l'évolution des inclusions de Lewy vues dans les synucléinopathies. Ce chapitre propose ici la description de deux théories d'initiation de la MP : tout d'abord la classification de Braak décrivant six stades de l'extension intracérébrale de la MP, menant à la **théorie de Braak** et la **théorie du seuil**, dernière théorie en date sur la pathogenèse de la MP, soulignant la progression simultanée de la pathologie dans les différents systèmes nerveux en fonction de la susceptibilité des neurones.

La théorie de Braak

Heiko Braak est un anatomopathologiste allemand né en 1937 et spécialisé dans la morphologie du système nerveux central. Toujours en activité et coauteur de plusieurs publications au cours de l'année 2017, ses recherches lui ont valu l'attribution d'une théorie éponyme.

La classification de Braak (Braak *et al.*, 2003)

Par l'étude de la distribution des corps de Lewy dans le cerveau de patients atteints ou non de la MP, Braak propose une classification des stades de la MP en fonction des zones cérébrales présentant ces corps de Lewy. Faisant le rappel du constat que la présence de dommages et d'altérations dans la SN est le marqueur majeur de la MP, mais que d'autres zones extra-nigrales du cerveau sont elles aussi atteintes, Braak s'interroge alors sur les voies d'initiation et d'évolution des pathologies parkinsoniennes. La question qu'il se pose alors est : « la pathologie évolue-t-elle de façon simultanée dans toutes les zones nigrales et extra-nigrales ou alors ces sites atteints ont-t-ils des susceptibilités différentes permettant l'apparition des corps de Lewy de façon séquentielle ? ».

Suite à l'analyse *post mortem* de cerveaux provenant de 41 patients diagnostiqués avec la MP, Heiko Braak propose alors une classification en différents stades, en fonction de l'avancement de la distribution des corps de Lewy et des neurites de Lewy dans le cerveau de ces patients. Braak remarque alors que les cas les plus faiblement affectés ont une distribution de corps de Lewy restants confinées dans le noyau dorsal IX/X ou dans la formation réticulée. De plus, il décrit qu'il n'est pas possible d'avoir des lésions corticales sans présence de corps de Lewy dans le tronc cérébral, ce qui suggère une possible progression ascendante des corps de Lewy vers les autres structures cérébrales. Braak et son équipe définissent alors 6 stades d'évolution de la MP, visible dans la figure 23.

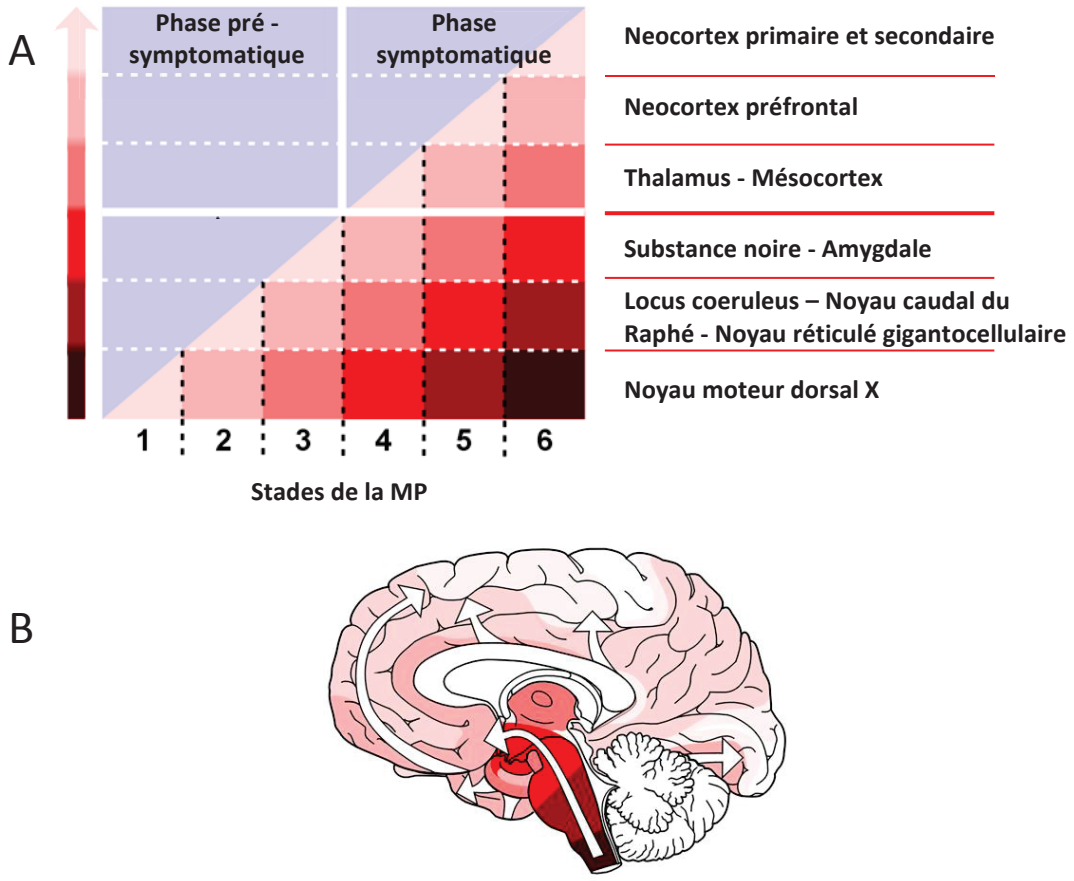


Figure 23 : Classification de la MP selon Braak. **A.** Phases pré-symptomatiques et symptomatiques selon la classification de Braak (Braak 2004). Les premières inclusions intracytoplasmiques de Lewy sont détectées dans le noyau dorsal du nerf X puis se propagent en suivant les réseaux neuronaux. La pente et les couleurs situées sous la diagonale indiquent la sévérité de la neuropathologie détectée dans la zone désignée. **B**. Schéma de la propagation de la pathologie selon l'hypothèse de Braak, les flèches blanches désignent la progression de la pathologie.

Stade 1

Le premier stade correspond à la détection de corps de Lewy dans deux lieux distincts du SNC : dans le tronc cérébral au niveau du noyau dorsal moteur du nerf vague et de la zone réticulée intermédiaire. D'un point de vue structurel, le noyau dorsal du nerf vague projette de longs axones préganglionnaires et amyélinisés reliant de façon directe, principalement par le nerf vague, le SNC aux cellules nerveuses postganglionnaires du SNE. L'autre zone atteinte par les corps de Lewy est le système olfactif, dont le noyau antérieur olfactif et le tractus nerveux présentent eux aussi des corps de Lewy et des neurites de Lewy. Le nombre de corps et de neurites de Lewy est relativement faible à ce stade, notamment dans le noyau dorsal du nerf vague et dans la zone réticulée intermédiaire.

Stade 2

Dans ce deuxième stade, les atteintes vues au stade 1 s'intensifient et progressent vers de nouvelles structures, les lésions se propagent au niveau de la formation réticulée, notamment des neurites de Lewy puis des corps de Lewy sont retrouvés au niveau des noyaux proximaux (noyau raphé caudal, noyau réticulaire gigantocellulaire, locus coeruleus et subcoeruleus). Ces noyaux contrôlent des fonctions somatosensorielles, viscerosensorielles et motrices par des projections faiblement myélinisées projetant dans les centres limbiques.

Les symptômes associés aux phases 1 et 2 ne sont pas moteurs et apparaissent une à deux décennies avant l'apparition des signes cliniques moteurs associés à la MP. En effet, seuls des troubles gastriques ou sensoriels (tels que des anosmies) sont présents dans ces phases, ce qui rend difficile le diagnostic de la MP à ce stade, hormis l'analyse de la substance noire. Il faudrait développer un test prenant en compte tous les symptômes non-moteurs, pour mieux diagnostiquer la MP chez les patients à ce stade bien avant les premiers signes moteurs.

Stade 3

Le troisième stade marque le début de la détection des agrégats intra-cytoplasmiques dans la substance noire, marqueur principal de la maladie de Parkinson. Ces inclusions colonisent aussi plusieurs zones aux alentours, comme l'amygdale ou le noyau gris

non-thalamique. La cinétique d'apparition des corps et neurites de Lewy dans la SN est particulière, des neurites de Lewy sont d'abord observées dans le noyau postérolatéral, puis ces inclusions intracytoplasmiques sont retrouvées dans les neurones dopaminergiques. Certains types neuronaux particuliers sont touchés à ce stade comme les neurones noradrénergiques du locus coeruleus, les neurones GABAergiques du noyau tubéromammilaire hypothalamique, les neurones cholinergiques du noyau pédonculo pontin, les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé. Dans la suite du noyau dorsal du nerf vague et du système nerveux entérique, le complexe amygdalien (projetant dans ces structures et recevant des connexions par le cortex temporal) présente lui aussi des lésions de type Lewy, en revanche, aucune lésion corticale n'est présente.

Au stade 3, la dégradation de la substance noire n'engendre pas encore l'apparition des premiers troubles moteurs associés à la MP, de plus, à ce stade, les lésions n'engendrent pas une dépigmentation de la substance noire

Stade 4

Cette phase marque la frontière entre la phase pré-symptomatique et la phase symptomatique, marquée par une perte de plus de 70% de neurones dopaminergiques de la substance noire. Le quatrième stade reprend toute la cartographie des lésions des stades précédant, tout en étant plus intense, notamment dans la substance noire, mais aussi dans le noyau sous-coeruleus, où il y a une forte dégénération. Ce stade est marqué aussi par la présence d'inclusions de type Lewy dans le cortex, plus précisément dans le mésocortex antéromédial temporal.

Stades 5 et 6

Les deux dernières phases cliniques de la MP sont marquées par l'évolution des lésions dans presque toutes les zones cérébrales épargnées jusqu'alors. Notamment dans les cortex frontaux, pariétaux et temporaux. À ces stades les symptômes de la maladie s'intensifient à mesure que les zones déjà touchées se saturent de corps et de neurites de Lewy. Dans ces phases symptomatiques avancées, la substance noire est particulièrement atteinte d'une dégénérescence des neurones pigmentés, d'ailleurs visible à l'œil nu. Plusieurs zones sont atteintes de façon sévère, comme le néocortex mais aussi les bulbes

olfactifs. Au stade 6, la totalité du néocortex présente des lésions, ainsi que les aires pré-motrices, motrices et sensorielles. Dans les deux derniers stades de la maladie, les lésions atteignant le cerveau dans une grande majorité des aires cérébrales engendrent des troubles moteurs et cognitifs forts. Notamment, les démences sont des troubles fréquents dans les derniers stades de la MP.

Vulnérabilité des neurones non myélinisés

Cet article publié par Braak et ses collègues (Braak *et al.*, 2003) ouvre la voie à des recherches plus fines sur l'α-syn, soulignant le fait que la substance noire n'est pas la première zone cérébrale présentant des lésions de type corps de Lewy ou neurites de Lewy. Les premières lésions visibles dans le système nerveux central apparaissent au niveau du tronc cérébral, dans le noyau dorsal du nerf vague. La publication en question détaille donc la cinétique de progression des lésions de type Lewy. Ainsi, les neurones les plus susceptibles de développer des corps de Lewy ou des neurites de Lewy présentent deux caractéristiques :

- Ce sont des neurones ayant des projections disproportionnellement longues par rapport à la taille de leur soma (Fig 24 C, adaptée de Braak 2004)
- Ce sont des neurones dont les axones sont peu ou pas myélinisés

À l'inverse, les neurones les plus résistants aux inclusions intra-cytoplasmiques auront les caractéristiques suivantes :

- Des projections courtes et ramifiées (Fig 24 A)
- Une gaine de myéline épaisse (Fig 24 B)

Les facultés neuro-protectives de la myéline seraient dues aux propriétés intrinsèques des neurones myélinisés : plus le neurone comporte une gaine de myéline épaisse, moins la transmission du signal demande d'énergie ; ceci pourrait réduire la vulnérabilité du neurone.

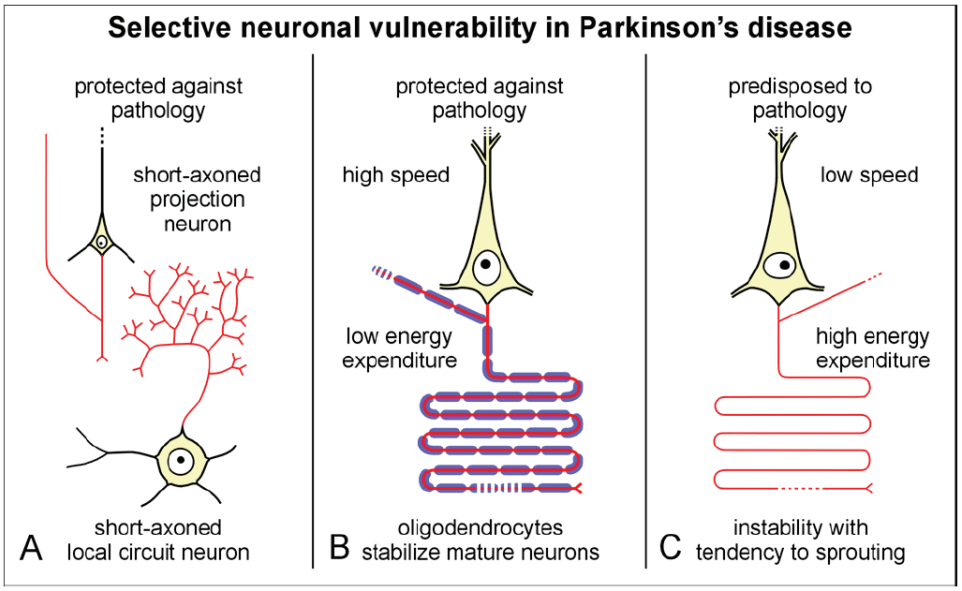


Figure 24 : Vulnérabilité sélective des neurones en fonction de leur myélinisation. Extrait de Braak et al., 2007.

La théorie du « *double hit* » - Théorie de Braak – (Hawkes *et al.*, 2007)

Forts de l'article décrivant la distribution des lésions de type Lewy dans le système nerveux central en fonction de l'avancement de la MP, Hawkes, Del Tredici et Braak proposent l'énoncé d'une théorie d'initiation de la MP : la théorie du « *double hit* » (Hawkes *et al.*, 2007).

Cet article datant de 2007 est une revue de la littérature faisant le constat que les atteintes extra nigrées précèdent les symptômes moteurs, elles doivent être prises en compte pour mieux définir la pathogenèse de la MP. Ils listent donc toutes les dysfonctions extra nigrées sous deux aspects : les troubles de l'odorat et les troubles du système nerveux autonome. Dans cet article, une description fine des stades prodromaux de la MP est faite, détaillant les troubles des systèmes nerveux périphériques vus dans la MP.

Les problèmes relatifs à l'odorat.

La phase présymptomatique de la MP est concomitante à des troubles divers relatifs à l'odorat et au goût. Ici sont décrits des tests psychophysiques (University of Pennsylvania

Smell Identification Test (UPSIT)) et neurophysiques (olfactory event-related response (OERP) permettant de mettre en avant des troubles sensoriels. Notamment, plusieurs études prospectives chez des individus à risque ont tenté de prédire la MP (Haehner *et al.*, 2007; Ponsen *et al.*, 2009). Ces études, au succès mitigé, ont tout de même permis de corréler des signes non moteurs au déclenchement de la MP, dans les années suivant le test. Cependant il est à noter que 10 à 20% des personnes diagnostiquée comme ayant la MP ont un odorat parfaitement fonctionnel (Hummel *et al.*, 2010).

Les problèmes relatifs au système nerveux autonome

L'autre aspect des dysfonctions extra nigrées se situe au niveau du système nerveux autonome, dont la structure est décrite au chapitre 5 de cette thèse. Ainsi, le tube digestif est innervé par deux nerfs : le nerf vague et les nerfs parasympatiques, et ces nerfs seraient impliqués dans les phases pré-symptomatiques de la MP. Un large éventail de troubles relatifs à ces nerfs est constaté et pourrait être en lien avec les stades initiaux de la MP. Des difficultés à avaler, des ballonnements, des nausées, constipations, perte d'appétit et perte de poids, sont des troubles mis en avant dans cette revue. Ici aussi des études prospectives ont déterminé que la constipation est un signe avant-coureur de la MP. Certaines études montrent qu'au minimum 60% des patient atteint par la MP ont des troubles intestinaux (constipations, troubles d'expulsion) (Cersosimo *et al.*, 2013), aussi, le temps d'expulsion des fèces s'allonge, passant de 20h chez les contrôles à plus de 40h chez les patients parkinsoniens (Rossi *et al.*, 2015).

Les troubles cardiaques font aussi partie de l'éventail des désordres liés au système nerveux autonome. Chez les patients atteints, un rythme cardiaque anormal est souvent diagnostiqué. Il est à noter que des corps de Lewy sont retrouvés dans le plexus cardiaque de certains patients décédés de la MP (Kasanuki *et al.*, 2015; Wakabayashi *et al.*, 1993). Des troubles du sommeil sont aussi détectés chez des patients parkinsoniens se caractérisant par des épisodes de mouvement oculaires rapides.

L'énoncé de la théorie de Braak

Pour résumé, Braak et ses collègues proposent une hypothèse concernant la provenance et la progression des corps de Lewy et neurites de Lewy :

"We propose that an unknown neurotropic pathogen initiating the pathological process underlying sporadic PD adopts a two-pronged attack on the nervous system: anterogradely, via olfactory pathways; and retrogradely, via enteric plexuses and preganglionic vagal fibres." (Hawkes et al., 2007)

« Nous proposons qu'un pathogène neurotrope initie les processus pathologiques des cas sporadiques de la MP par une double attaque sur le system nerveux : de façon antérograde par les bulbes olfactifs et de façon rétrograde par les plexus entériques et les fibres préganglioniques vagales »

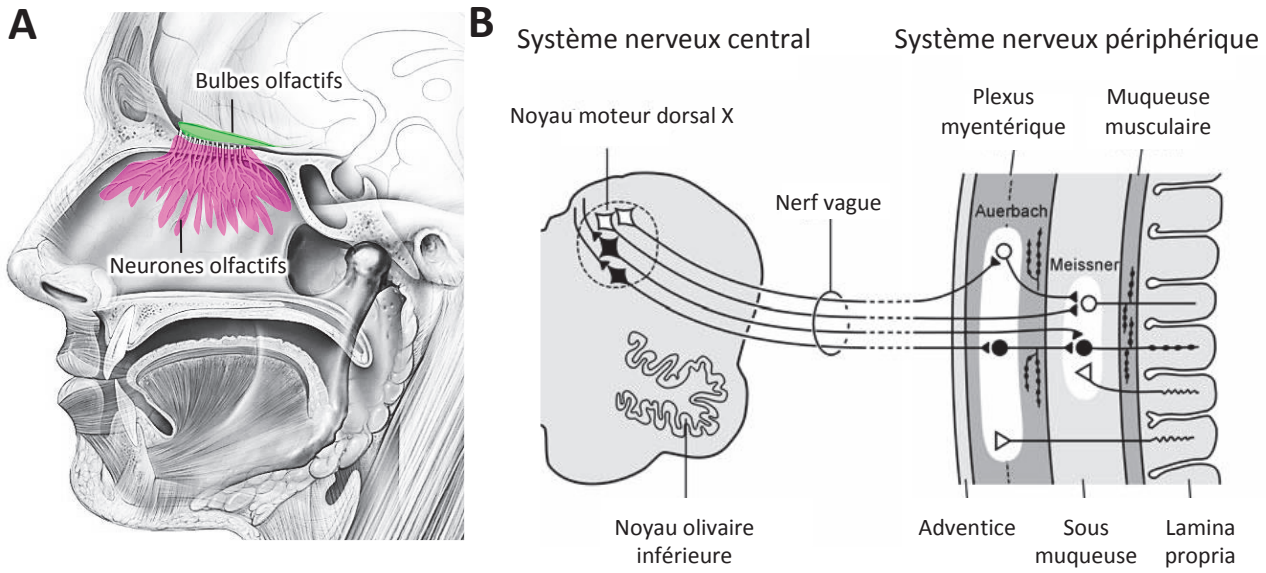


Figure 25 : Représentation schématique des deux voies d'entrée de l'agent pathogène neurotrope selon la théorie de Braak. **A**. Bulbes olfactifs et neurones olfactifs. **B**. Schéma de l'innervation du système nerveux entérique, relié au système nerveux central par le nerf vague. Adapté de Braak et al., 2007.

Crédibilité de la théorie

+ En faveur

- Théorie très étudiée et éprouvée, commençant à faire consensus.
- La transconformation depuis une structure en hélice α vers un feuillet β va dans le sens de cette théorie.
- La propagation de cellule à cellule de l'α-syn est démontrée par des greffes de neurones.

– En défaveur

- L'apparition précoce des perturbations des mouvements oculaires rapides est incohérente.
- La théorie de Braak pourrait ne pas expliquer toutes les formes de la MP.
- Il y a peu de relations entre la classification de Braak et la sévérité apparente de la MP.

La théorie de Braak possède donc les arguments en faveur et en défaveur. Cette théorie est la théorie la plus reprise dans l'étude l'initiation de la MP, cela ne signifie pas pour autant que cette théorie soit juste et notamment applicable à tous les cas de la MP.

Cette théorie implique la diffusion « prion like » de l'α-syn pathologique, de cellule à cellule, avec une action de « seeding », c'est-à-dire de d'engranger à partir d'une « graine », ici l'α-syn transconformée, la transconformation d'autres protéines, comme il a déjà été décrit dans le chapitre précédent. L'un des arguments majeur dans cette théorie est l'article de Kordower et collègues (Kordower *et al.*, 2008). Pour aller plus en détail dans cette étude, celle-ci porte sur une patiente atteinte de la MP, greffée dans le putamen avec un greffon solide de mésencéphale ventral embryonnaire humain dans le but d'améliorer ses symptômes moteurs. Après cette greffe, ses symptômes se sont améliorés, puis sont réapparu 10 ans après la greffe. La patiente est décédée 14 ans après l'opération. L'élément marquant de cette étude est que l'étude des neurones greffés montre des inclusions intracytoplasmiques d'α-syn agrégée et non-agrégée dans 2 à 5 % de ceux-ci. Ceci sous-entend la diffusion de la pathologie parkinsonienne dans les neurones greffés de cellule à cellule, ainsi cette colonisation en α-syn agrégée pourrait s'apparenter à un mécanisme de type prion, d'où l'appellation « prion-like ». Cependant, cette diffusion de proche en proche ne suffit pas définir l'α-syn comme étant prion-like. L'α-syn ainsi transférée (mal repliée)

dans la cellule exogène doit pouvoir aussi « corrompre » et recruter la forme native de la protéine pour être définie comme prion-like (Dunning *et al.*, 2013). Cependant ce mécanisme n'a encore jamais été clairement démontré.

Les arguments en défaveur de la théorie de Braak sont que cette théorie ne s'applique pas à tous les cas de la MP. En effet, la substance noire est atteinte dans 100% des cas de la MP, cependant certaines zones selon les patients ne sont pas atteintes. Selon les études cliniques post-mortem, environ 7% des patients parkinsoniens montrent un noyau dorsal du nerf vague exempt d'α-syn pathologique (Kalaitzakis *et al.*, 2008). Cette étude a aussi montré que 47% des cas de la MP ne suivent pas une ascension progressive, caudo-rostrale, des corps de Lewy lors de la MP. Le fait qu'entre 6,3 et 47% de tous les cas cliniques, confirmés par analyses *post-mortem* ne suivent pas strictement la classification de Braak, et que dans environ 7% des cas le noyau dorsal du nerf vague est exempt de toute pathologie malgré une pathologie présente dans le tronc cérébral supérieur ou même les régions corticales suggèrent que la progression ascendante proposée par la classification peut ne pas être la seule voie possible de progression de la maladie. (Attems et Jellinger, 2008; Burke *et al.*, 2008; Jellinger, 2009; Parkkinen *et al.*, 2008).

La théorie de Braak n'est pas ou peu associée à la sévérité de la MP. En effet, si la classification de Braak représente l'évolution temporelle réelle de la MP, il devrait y avoir une relation entre les stades de Braak et la durée ou la sévérité de la maladie. Cependant la classification de Braak ne donne aucune échelle de temps ou de gravité de la MP en fonction des stades exposés. Aussi, certains patients présentant une distribution des inclusions de Lewy associée aux stades 4 de la classification de Braak et plus, ne présentent pas de signes de parkinsonisme.

L'apparition précoce des troubles de mouvements oculaires rapides vus 10 ans avant l'apparition des troubles moteurs parait incohérente avec la classification de Braak. Ce trouble non moteur est prédictif d'une maladie neurodégénérative. Entre 81 et 90% des patients ayant des troubles de mouvements oculaires rapides déclencheront une maladie neurodégénérative, dont 50% développeront une MP pendant la décennie suivante. Ces

troubles, présents bien avant les symptômes moteurs, sont dus à une accumulation d'α-syn pathologique dans le tronc cérébral (Howell et Schenck, 2015; Seidel *et al.*, 2015)

En conclusion, la théorie de Braak pourrait n'être valable que pour une partie de tous les cas de la MP, ceci montrant la variété des types de MP rencontrée.

Théorie alternative : La théorie du seuil

En début d'année 2017, une théorie alternative à la théorie de Braak vient proposer une alternative possible à l'initiation de la MP, la théorie du seuil (« *Threshold theory* »). La théorie de Braak, comme décrit dans le paragraphe précédent fait état d'une ascension de l'α-syn le long des nerfs périphériques pour atteindre le cerveau. La théorie alternative proposée ici par Engelender et collègues propose une initiation simultanée dans tous les systèmes nerveux, tant centraux que périphériques (Engelender et Isacson, 2017).

La théorie du seuil n'impliquerait pas la dissémination de l'α-syn de cellule à cellule de type prion, mais les neurones atteindraient un « seuil » de pathologie avec le vieillissement de l'individu menant à l'accumulation pathologique de l'α-syn dans les cellules et, en fonction de la quantité de protéines toxiques qu'ils peuvent tolérer, cela mènerait à leur dégénération. Par exemple, les neurones du système nerveux périphérique auraient un seuil de déclenchement de la pathologie bas, alors que les neurones du système nerveux central auraient un seuil de déclenchement haut, ce qui expliquerait les symptômes non moteurs détectés bien avant les symptômes moteurs. Les chercheurs spéculent donc sur le fait que dans le SNE il n'y aurait pas de mécanismes permettant de compenser un dysfonctionnement lié à l'α-syn et ces neurones auraient donc un seuil de tolérance plus faible pour la toxicité de l'α-syn.

Cette théorie s'appuie aussi grandement sur les critiques de la théorie de Braak faite dans les pages précédentes. Elle s'appuie surtout sur le fait qu'il n'y a encore aucun consensus qui n'a pu être déterminé dans les mécanismes d'initiation de la pathologie et que la théorie de Braak reste contestée par de nombreux groupes (Burke *et al.*, 2008). Dans

une étude précédente, l'étude des cerveaux de 71 patients décédés da la MP a permis de montrer que 47% des cas ne présentaient pas un schéma de dissémination de l'α-syn attendu par la théorie de Braak et que 7% avaient un noyau dorsal du nerf vague exempt de toute inclusion de Lewy. (Kalaitzakis *et al.*, 2008).

L'autre problème que voit l'auteur dans la théorie de Braak est l'apparition des troubles des mouvements oculaires rapides, vus dans les phases pré-symptomatiques de la MP. Ces troubles sont forcément associés avec des défauts au niveau de la formation réticulée et montrent une apparition généralisée des inclusions de Lewy, expliquant leur théorie du seuil.

Les auteurs de cette théorie mettent l'accent sur le fait qu'il serait plus intéressant de comprendre pourquoi l'α-syn s'accumule dans les neurones et comment ces neurones meurent dans la maladie plutôt que d'étudier les mécanismes de propagation de type prion de la protéine.

Crédibilité de la théorie

+ En faveur

- Théorie novatrice prenant en compte d'autres arguments concernant la MP.
- Théorie couvrant mieux la neuropathologie observée chez les patients parkinsoniens.
- Les expérimentations murines avec injections systémiques de neurotoxiques montrent un déclenchement précoce dans le SNE

– En défaveur

- Théorie très peu étudiée et citée, peine à se faire une place avec la force que représente la théorie de Braak.
- Cette théorie ne s'associe pas à tous les cas de la MP non plus.
- Des recherches restent encore à être menées pour étayer les arguments des auteurs de cette théorie.

L'un des arguments majeurs de cette théorie est que la progression des lésions ne correspond pas à la sévérité apparente de la pathologie. De plus, des disparités existent entre la présence d'inclusions intra cytoplasmiques et la perte neuronale. Bien qu'il y ait une certaine superposition entre régions présentant des corps de Lewy et celle présentant une perte neuronale, la gravité des symptômes observés et la distribution des régions affectées au cours de la MP indiquent des schémas de progression différents, visibles sur la figure 26. Ces schémas de progressions semblent d'ailleurs indépendant des projections neuronales suggérant que la propagation de type « prion-like » par les connexions neuronales serait peu probable et d'autres éléments entreraient en jeu dans la progression des inclusions pathologiques (Surmeier *et al.*, 2017).

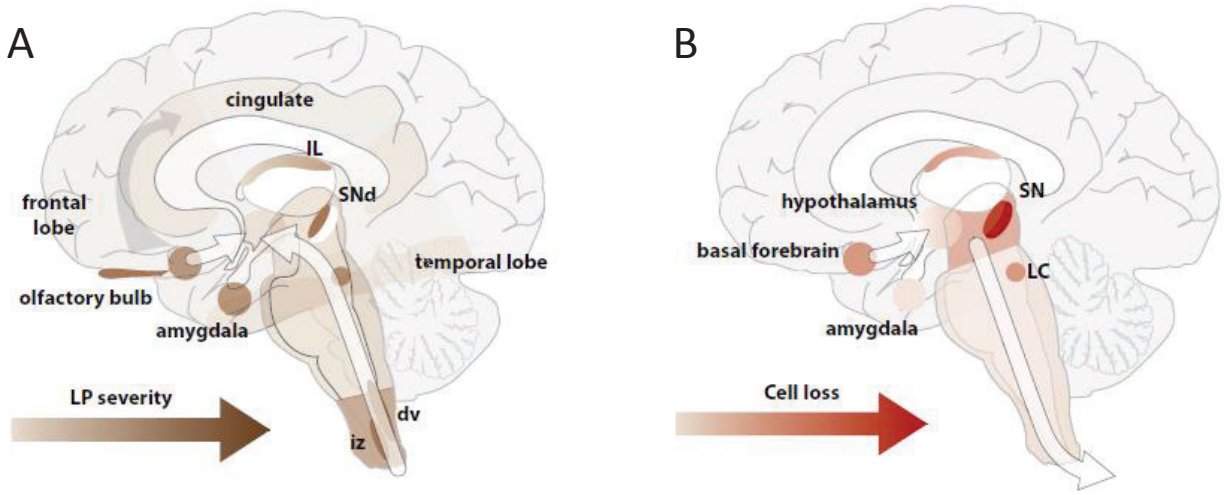


Figure 26 : Comparaison entre (**A**) la distribution des corps de Lewy observés dans la MP et (**B**) les zones présentant des pertes neuronales. Ces zones ne se superposent pas parfaitement. Adapté de (Surmeier *et al.*, 2017)

Les théories d'initiation de la MP sont enthousiasmantes et permettent d'expliquer la pathogenèse pour différents sous-groupes de la maladie, sans pour autant faire consensus auprès des spécialistes. Des recherches restent à être menées pour comprendre les mécanismes réels, précédant l'apparition des premiers corps de Lewy et expliquant la cause de cette apparition. Aussi différentes soient-elles en termes d'initiation de la pathologie, ces deux théories font écho de troubles au niveau du système nerveux périphérique. Plusieurs liens ont été démontrés entre les stades pré-symptomatiques de la MP et le système nerveux entérique (SNE), notamment avec la présence de forme pathologiques de l'α-syn dans les plexus nerveux du SNE.

V. Système nerveux entérique et maladie de Parkinson

En lien avec les théories d'initiation de la MP, ce chapitre propose ici des rappels sur la structure du système nerveux entérique, ses connexions avec le système nerveux central et les pathologies liées à l'α-syn dans l'intestin, inhérents à la MP.

Le système nerveux central

Le système nerveux central est composé du cerveau et de la moelle épinière. Il centralise toutes les informations afférentes et permet notamment le contrôle de l'ensemble du corps humain, tant par les mouvements, les émotions et les fonctions autonomes. Penser, percevoir, planifier, et comprendre un langage font partie des attributions du cerveau. Le système nerveux central est protégé par la barrière hématoencéphalique (BHE), permettant une protection optimale du SNC contre les agents exogènes infectieux ou chimiques.

La moelle épinière est composée majoritairement de projections neuronales provenant du cerveau (efférentes) ou du système nerveux périphérique (afférentes). Elle est donc une extension du cerveau protégée par la colonne vertébrale. Son rôle principal est de recevoir et d'envoyer des informations sensorielles ou motrices dans toutes les parties du corps inférieures à la tête. En lien avec la théorie de Braak, deux zones cérébrales sont mises en avant : le tronc cérébral et les bulbes olfactifs.

Tronc cérébral

Le tronc cérébral (TC) est une zone particulière du cerveau reliant la moelle épinière au cerveau, situé en avant du cervelet (Figure 27 A). Le TC est le lieu de départ de dix des douze nerfs crâniens (du IIIème au XIIème). C'est ici que circulent toutes les informations motrices et sensorielles pour toutes les parties du corps situées sous cet organe. Il s'agit d'une partie extrêmement importante du cerveau, car les connexions nerveuses entre les

systèmes moteurs et sensoriels présents dans le cerveau et les effecteurs/récepteurs présents dans le reste du corps transitent par le TC.

Le TC joue également un rôle important dans la régulation de fonctions autonomes telles que le système cardiovasculaire ou respiratoire. Ainsi, le TC participe à la régulation de nombreuses fonctions fondamentales, dont la fréquence cardiaque, la respiration, le sommeil et la digestion.

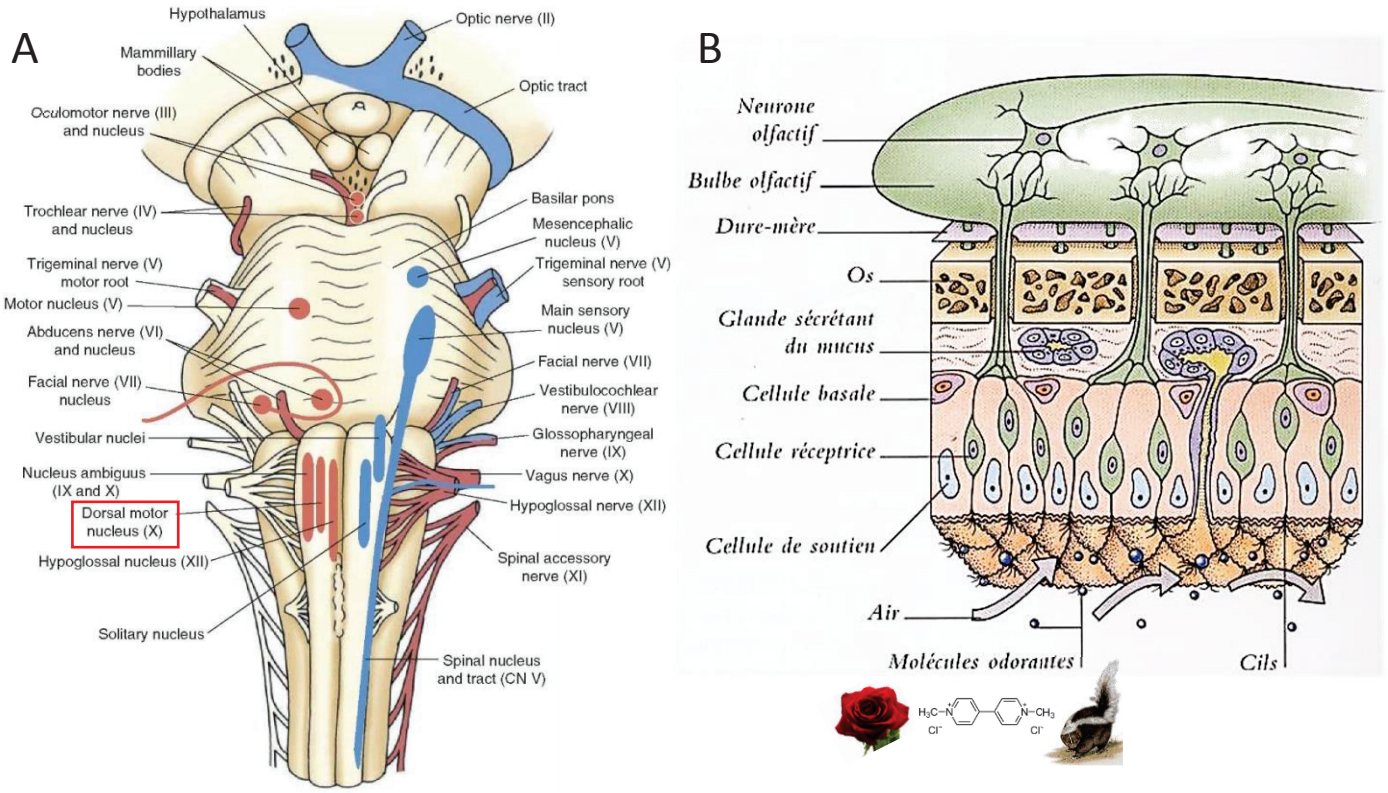


Figure 27 : Structure neuro-anatomiques du tronc cérébral et des neurones olfactifs. A. Représentation des différents noyaux des nerfs crâniens, encadré en rouge, le noyau dorsal du nerf vague. B. Représentation du bulbe olfactif et de sa connexion avec l'environnement extérieur par les neurones olfactifs. Ces neurones peuvent capter les molécules odorantes mais aussi ils peuvent être mis en contact directement avec des neurotoxiques de l'environnement extérieur.

Bulbes olfactifs

Les bulbes olfactifs sont situés à l'avant du cerveau chez la majeure partie des vertébrés. Chez l'homme, ils sont situés sous les cortex frontaux, au-dessus des fosses nasales. Ces fosses nasales sont tapissées d'une muqueuse : l'épithélium olfactif, dont le rôle

principal est de détecter les molécules aromatiques environnantes respirées par l'individu (Figure 27 B). Cet épithélium comporte des neurones appelés neurones récepteurs olfactifs (NRO) (Nagayama *et al.*, 2014). Ces neurones bipolaires comportent en leurs extrémités des cils captant les molécules olfactives respirées rejoignant la muqueuse nasale, et ils projettent leur axone directement dans les glomérules olfactifs présents dans les bulbes olfactifs. Ces neurones sont donc une porte d'entrée directe sur le cerveau, ils ont des systèmes de protection plus poussés que d'autres structures cérébrales moins exposées aux facteurs environnementaux. Parmi ces systèmes de protection il y a le mucus tapissant l'épithélium olfactif, fluide ayant une forte activité protéolytique et métabolique. Ce mucus est renouvelé continuellement pour être ensuite évacué vers l'œsophage où la digestion va se charger d'éliminer ou de métaboliser ces contaminants. Ainsi avec cette conformation particulière, la majeure partie des contaminants captés par le mucus vont être transportés dans l'estomac pour une élimination. Tout contaminant respiré est donc possiblement mis en contact avec le système digestif. (Livre *Exposure Analysis* publié par Wayne R. Ott, Anne C. Steinemann, Lance A. Wallace).

Le système nerveux entérique

L'intestin est souvent appelé le « deuxième cerveau » à cause du nombre important de neurones constituant son système nerveux, le système nerveux entériques (SNE). Selon les estimations, il est composé de 200 à 600 millions de neurones, comparativement au cerveau qui lui est composé d'environ 86 milliards de neurones (Azevedo *et al.*, 2009). Le SNE est une structure quasi autonome composées de circuits contrôlant, entre autres, la digestion, des fonctions motrices comme le péristaltisme, le flux sanguin local, les fonctions des muqueuses et des fonctions endocrines. Ce chapitre détaille la structure et l'innervation du système nerveux entérique.

La maladie de Hirschsprung est une maladie génétique touchant une naissance sur 5000 en moyenne (Amiel *et al.*, 2008). Cette maladie se caractérise par l'absence de ganglions entériques (absence des plexus myentériques et sous-muqueux) sur une longueur variable de l'intestin, principalement dans les parties distales. Le SNE ne se développe donc pas dans

les parties concernées (Langer, 2013), et ceci provoque une interruption du transit intestinal menant à l'accumulation des fèces dans l'intestin aganglionique pouvant entrainer la mort du nouveau-né s'il ne bénéficie d'aucune intervention médicale. Une intervention chirurgicale est possible et consiste en la résection de la partie du colon non pourvue de SNE. Ceci montre l'importance du système nerveux entérique dans le processus de digestion. A l'inverse, même si la perte des neurones entériques est létale, une rupture de la connexion entre le SNE et le SNC n'entraîne que très peu de défauts. La vagotomie est même utilisée en traitement de patients ayant des ulcères peptiques (Lagoo *et al.*, 2014). Ceci montre la relative indépendance du SNE par rapport au SNC dans les taches qu'il effectue, faisant de lui un système nerveux « autonome ».

Structure anatomique du tube digestif

Le tube digestif est composé de l'œsophage, de l'estomac et des intestins, comprenant l'intestin grêle avec le **duodénum**, le **jéjunum** et l'**iléon**, et le gros intestin, composé du **caecum** et du **colon**. Le rôle du tube digestif est de métaboliser les nutriments apportés par le bolus alimentaire. Dans notre étude le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le caecum et le colon sont nos sections d'intérêt.

Bases de l'innervation gastro intestinale

Le SNE est relié au SNC par l'intermédiaire du nerf vague, projetant directement depuis le noyau dorsal du nerf vague se situant dans le TC, jusque dans les plexus neuronaux présents dans le SNE, comme il est indiqué sur la Figure 28 (Rao et Gershon, 2016).

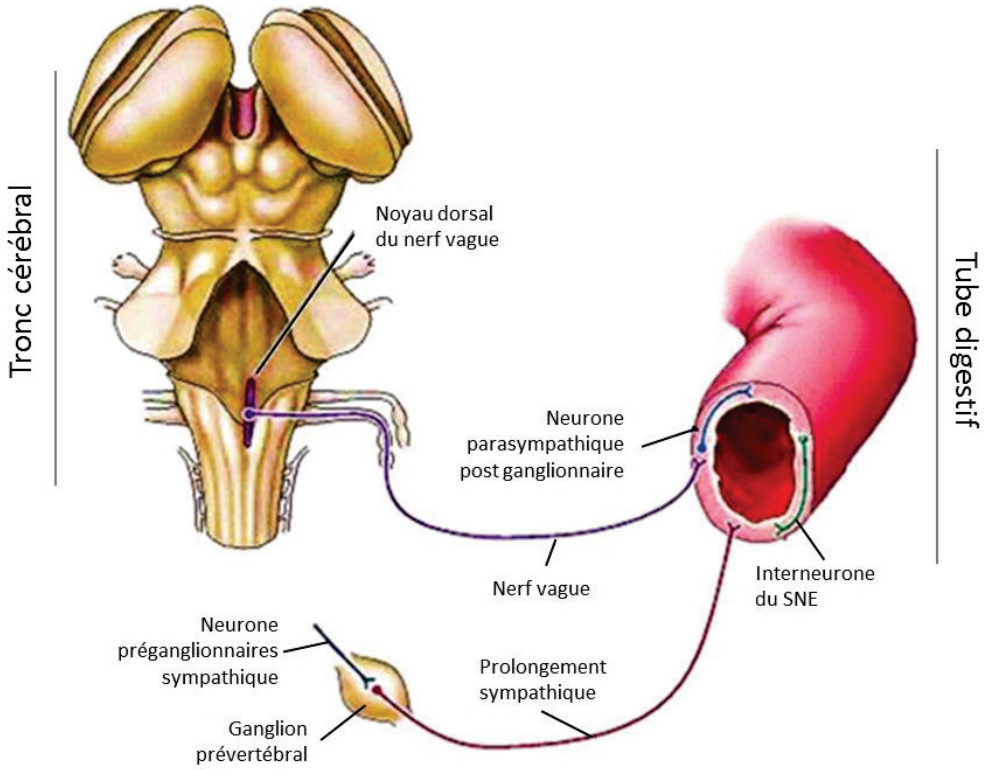


Figure 28 : Connexions entre le TC et le SNE. Le nerve vague projette directement dans les plexus entériques pour les actions parasympathiques, les projections sympathiques sont d'abord reçues par un ganglion prévertébral. Adapté de (Rao et Gershon, 2016)

Le noyau dorsal du nerf vague

Le noyau dorsal du nerf vague (DMV, Dorsal Motor nucleus of Vagus nerve), est un noyau pair de forme allongée situé des deux côtés de la médulla oblongata dans le tronc cérébral. C'est ce noyau qui centralise les fibres autonomiques préganglionnaires parasympathiques innervant le tractus gastrique (Greene, 2014). Les axones issus du DMV innervent le système digestif depuis le bas de l'œsophage jusqu'au colon. Il innerve aussi d'autres organes ayant des fonctions autonomes, par exemple une partie du système cardiovasculaire est innervée par le nerf vague.

D'un point de vue structurel, le DMV est composé de neurones dont les axones sont fins, très ramifiés et peu ou pas myélinisés. Ces neurones sont principalement acétylcholinergiques et projettent directement dans le SNE par l'intermédiaire du nerf vague.

Le nerf vague

Le nerf vague est le nerf crânien le plus long, innervant une multitude d'organes tels que le foie, les reins, le cœur, les poumons, la rate et les intestins (Powley et Phillips, 2002). Il est un nerf important dans la régulation des fonctions autonomes, particulièrement dans la digestion, le rythme cardiaque et d'autres fonctions accessoires supportées par le foie, la rate ou la vésicule biliaire. Ce nerf est composé de 40 000 à 50 000 axones (Sengupta et Gebhart, 1994), et permet le contrôle parasympathique du tube digestif par ses projections efférentes. Les projections efférentes du SNE proviennent du DMV, et forment des synapses directement avec les neurones des ganglions entériques.

Les ganglions entériques du SNE

Le SNE est constitué de deux plexus ganglionnaires couvrant la totalité du tube digestif : le plexus myentérique, appelé aussi plexus d'Auerbach et le plexus sous muqueux, appelé aussi plexus de Meissner.

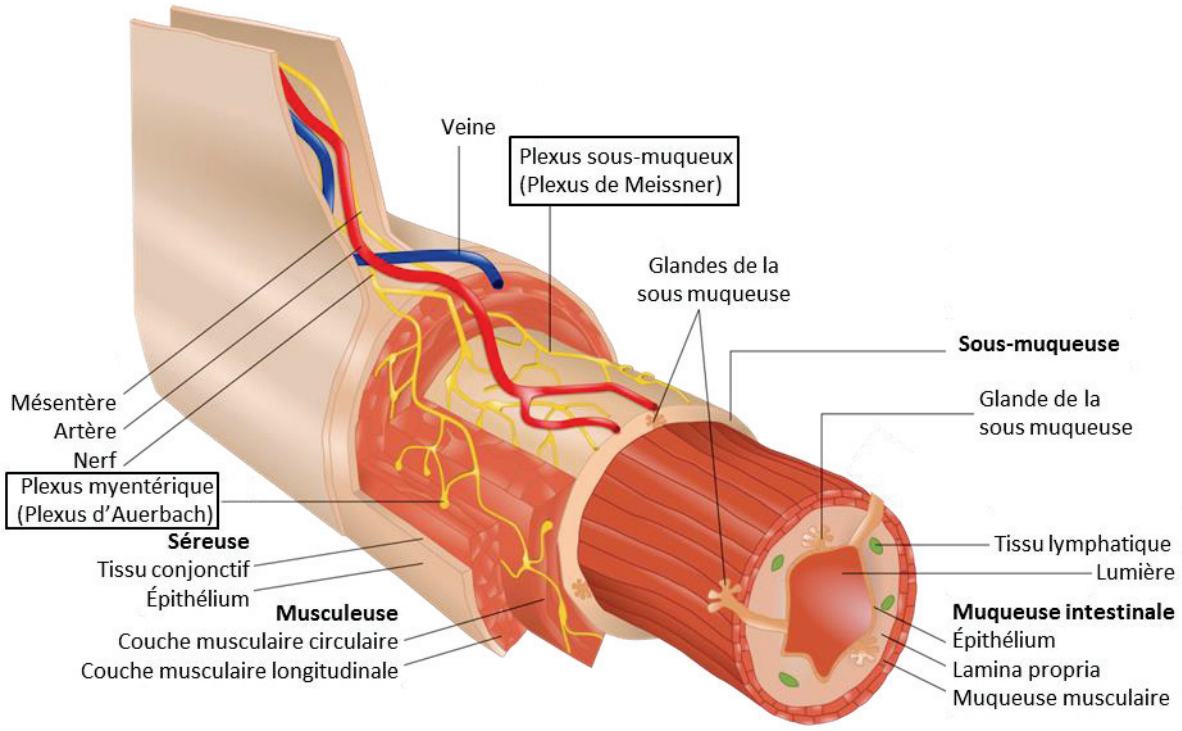


Figure 29 : Représentation schématique de la structure du SNE. Deux plexus nerveux sont identifiés, le plexus myentérique, appelé plexus d'Auerbach, et le plexus sous-muqueux, appelé plexus de Meissner. Adapté de (Rao et Gershon, 2016), source Wikimédia common.

- Plexus myentérique :

Le plexus myentérique forme un réseau continu autour de l'intestin et s'étend de l'œsophage supérieur jusqu'à l'anus. Ce plexus est situé dans la couche musculaire entourant le tube digestif, ce qui lui a valu ce nom de « myentérique ». Il a pour rôle de contrôler les couches musculaires longitudinales et circulaires présentes dans l'intestin, ayant une action sur le péristaltisme intestinal. Le plexus myentérique reçoit directement des impulsions provenant du nerf vague, et celui-ci transmet l'information aux cellules musculaires impliquées dans ce péristaltisme. Il est à noter que le contrôle de cette activité est involontaire.

- Plexus sous-muqueux

Le plexus sous-muqueux est le plexus le plus proche de la lumière intestinale, il est situé sous la muqueuse. Ce plexus est formé lui aussi de ganglions non-myélinisés innervant l'épithélium intestinal, il aurait donc pour rôle d'assurer les fonctions de la muqueuse, telle que des fonctions endocrines ou vasculaires (Schemann et Neunlist, 2004).

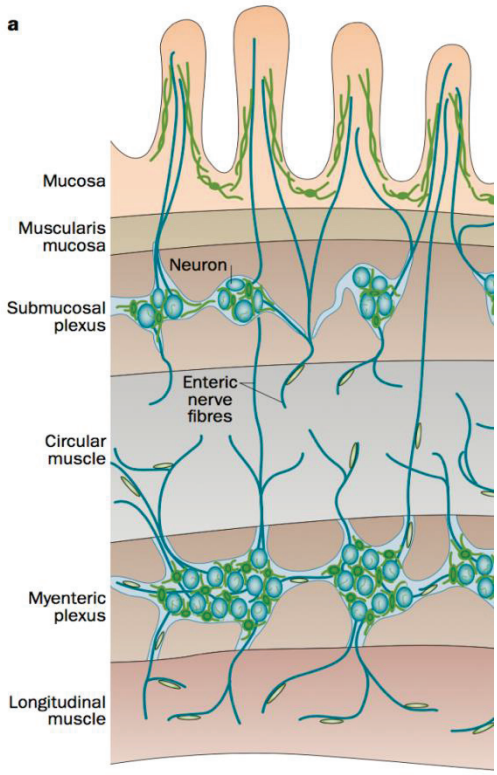


Figure 30 : Structure simplifiée des connexions entre les ganglions entériques. Le nerf vague innerve directement le plexus myentérique, lequel convoie l'information de contraction aux couches musculaires circulaires ou longitudinales. Ce plexus est aussi relié au plexus sous muqueux, lequel projette vers différents types de cellules dans la muqueuse intestinale. Adapté de (Gulbransen et Sharkey, 2012)

La barrière intestinale

L'épithélium intestinal est une couche monocellulaire constituant barrière la plus étendue contre l'environnement extérieur. Cet épithélium agit comme une protection sélectivement perméable, permettant l'absorption de nutriments, d'électrolytes et d'eau, tout en maintenant une défense efficace contre les toxines absorbées, les antigènes et la flore entérique.

Cet épithélium est composé de 3 éléments majeurs :

- Le mucus intestinal forme une couche qui sépare la majeure partie du contenu luminal de l'épithélium intestinal. Ce mucus est un liquide visqueux hautement glycosylé composé de mucine. Le mucus empêche les particules ingérées de se mettre en contact avec la couche de cellules épithéliales tout en permettant à de petites molécules de passer.

- L'épithélium intestinal est composé d'une couche de cellules épithéliales recouvrant toute la lumière l'intestin. C'est cette couche cellulaire qui contrôle l'absorption sélective dans le corps d'ions, d'éléments nutritifs et d'autres substances provenant de la lumière.

- Le microbiote intestinal est un élément important à prendre en compte dans la composition de la barrière intestinale. Il intervient dans de nombreuses voies de digestion primaire, comme la fermentation, le métabolisme des sucres et des protéines ainsi que le métabolisme des acides biliaires et des xénobiotiques. Des études suggèrent que le microbiote intestinal est modifié dans la MP et que celui-ci pourrait être impliqué dans l'initiation de cette maladie (Scheperjans *et al.*, 2015; Wood, 2015).

Malgré la présence de cette barrière, ce système de défense n'est pas parfait et des composés neurotoxiques peuvent la traverser. Par exemple, une étude *ex-vivo* à partir d'intestin de rat montre que le paraquat peut être absorbé par la muqueuse intestinale (Silva *et al.*, 2015).

Composition des plexus entériques

D'un point de vue cellulaire les plexus nerveux entériques sont composés de neurones et de cellules gliales, sous une structure assez proche du SNC. Parmi ces neurones, trois grands types de neurones ont pu être identifiés (Costa *et al.*, 2002; Furness, 2006).

- Motoneurones (excitateurs ou inhibiteurs)

Dans les plexus entériques, ces neurones contrôlent la motilité et les secrétions intestinales. Les cibles effectrices de ces neurones sont variées, ils peuvent agir sur les cellules des muscles lisses, les cellules sécrétoires ou encore les cellules endocrines de l'intestin.

- Interneurones

Les interneurones connectent des neurones entre eux en formant un réseau cellulaire. Dans le plexus myentérique, ce type cellulaire forme des chaînes de neurones faisant partie intégrante de l'innervation intrinsèque (Costa *et al.*, 2000).

- Neurones sensoriels

Les neurones sensoriels, aussi appelés neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN, intrinsic primary afferent neurons) ont un rôle de sondes. En effet, ils détectent l'état physique et mécanique de l'intestin, ainsi que les stimuli chimiques provenant de la lumière intestinale, afin de transmettre ces informations mécaniques aux ganglions du SNE. Les IPAN sont connectés entre eux par l'intermédiaire d'interneurones et connectés directement à des neurones moteurs. Ils représenteraient 10 à 30% des neurones entériques (Furness, 2006).

Les cellules gliales entériques

L'épithélium intestinal constitue une barrière physique et biologique entre l'environnement extérieur et l'intestin. Cet épithélium est constitué d'une couche de cellules épithéliales sur toute la surface interne de la lumière intestinale et il est maintenu par un ensemble de jonctions intercellulaires. Cet ensemble de cellules limite la pénétration de pathogènes ou de toxines environnementales dans l'organisme de l'hôte. Si cette barrière

est rompue, des processus de protection se mettent en place, c'est là qu'interviennent les cellules gliales entériques.

Sous la barrière épithéliale intestinale se trouve une population de cellules semblables à des astrocytes appelées cellules gliales entériques (CGE). Ces CGE sont assez semblables aux astrocytes présents dans le cerveau, partageant donc des caractéristiques morphologiques et des marqueurs d'expression similaires tels que la GFAP (Clairembault *et al.*, 2014). Longtemps décrites comme cellules assurant seulement le soutien, en plus d'avoir ce rôle dans le maintien de l'intégrité des ganglions entériques, il été montré que les CGE auraient aussi un rôle dans les fonctions de l'épithélium intestinal (Neunlist *et al.*, 2013). En effet, comme il est visible sur la figure 31, les CGE sont présents dans les plexus neuronaux, mais elles sont aussi distribuées tout le long de cet épithélium. Le ratio neurones/cellules gliales serait de 1 pour 4, montrant une large prépondérance des CGE dans le SNE, formant donc un large réseau tout au long du tube digestif.

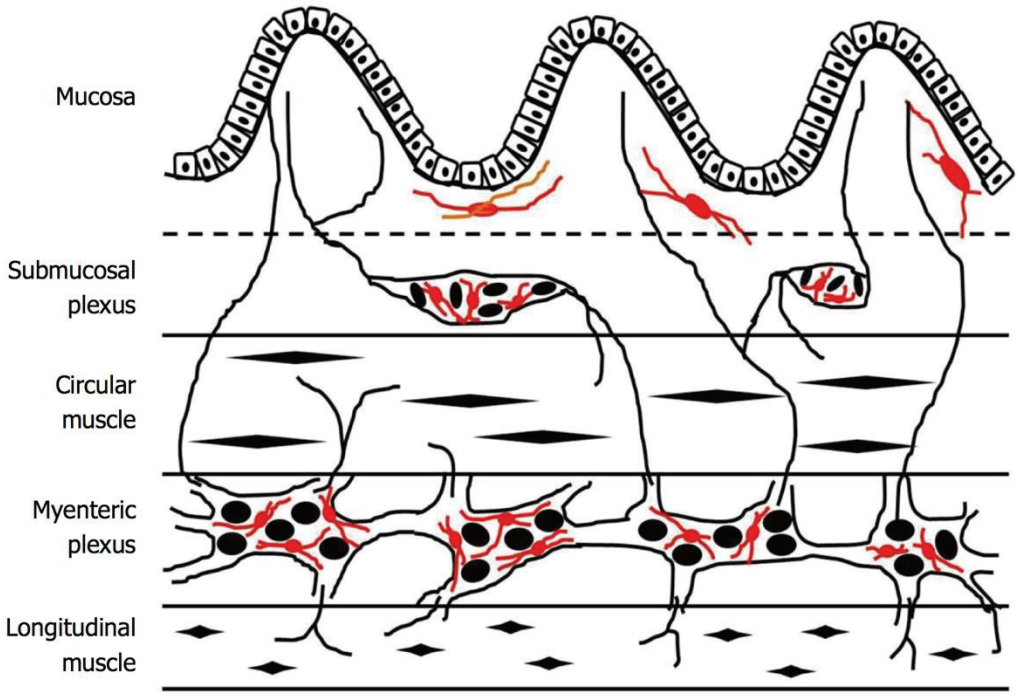


Figure 31 : Représentation de la distribution des cellules gliales entériques dans le système nerveux entérique. En rouge, les CGE distribuées dans les plexus entériques mais aussi le long de l'épithélium, en noir les somas des neurones entériques schématisés dans les plexus. Tiré de (Yu et Li, 2014)

Les atteintes entériques dans la MP

Les premières descriptions de la MP faites par James Parkinson en 1817 font état de troubles intestinaux prononcés (Parkinson, 2002). Depuis, les travaux sur les atteintes du SNE et la MP ont pris de plus amples proportions, faisant de ce système nerveux, selon la théorie de Braak, un des sites d'initiation possible de la maladie.

Troubles du SNE et MP

Les troubles non moteurs sont retrouvés dans la majorité des cas de la MP, et sont présents une à deux décennies avant l'apparition de symptômes moteurs. Sont rapportés parmi ces troubles des constipations (67% des patients), des défécations incomplètes (51%) ou des gastroparésies (70 à 100%) (Goetze *et al.*, 2006; Khoo *et al.*, 2013; Marrinan *et al.*, 2014; Pellegrini *et al.*, 2015)

Les troubles gastro-intestinaux sont retrouvés dans une grande majorité des cas de la MP. Ils se caractérisent par un dérèglement de la fréquence des selles, diminuant à 3 selles par semaine ou moins. Ce dérèglement physiopathologique est associé à un allongement du temps de transit des selles, lié à des défauts de motilité intestinale (Knudsen *et al.*, 2017; Sakakibara *et al.*, 2003). Ces troubles gastro-intestinaux pourraient être dus aux mêmes inclusions intracytoplasmiques de Lewy détectées dans les cerveaux de patients atteints de MP. En effet, dans les années 80, des études ont été les premières à montrer des corps de Lewy dans l'œsophage ou dans les plexus myentérique et sous-muqueux du colon d'un patient parkinsonien (Kupsky *et al.*, 1987; Qualman *et al.*, 1984).

Les corps de Lewy dans le système nerveux entérique

Il est rappelé plusieurs fois dans ce document que l'α-syn hyperphosphorylée est le marqueur cérébral principal de la MP. Chez l'homme, beaucoup d'études ont montré la présence de ces inclusions intracytoplasmiques dans les plexus du SNE pour la grande majorité des patients parkinsoniens (Beach *et al.*, 2016; Derkinderen *et al.*, 2011) ou atteints de démence à corps de Lewy (Beach *et al.*, 2010b). Cependant la présence de cette α-syn

pathologique serait moins fréquente chez les patients atteints de MSA, mais de tout de même détectable dans certains cas (Pouclet *et al.*, 2012).

Les premières constatations de la présence d'inclusions de Lewy dans le tractus digestif de patients parkinsoniens remontent donc au début des années 80 (Kupsky *et al.*, 1987; Qualman *et al.*, 1984). Ces années précédant la théorie de Braak sont marquées par un très faible nombre de publications faisant écho à la présence de corps de Lewy dans le SNE. Quelques études principalement menées par Wakabayashi et ses collègues, ont montré la présence de corps de Lewy dans les plexus entériques à partir de biopsies (Wakabayashi *et al.*, 1990; Wakabayashi *et al.*, 1988, 1989).

Dans son article de 1997, Wakabayaski montre ainsi qu'en plus d'être une maladie cérébrale, la MP pourrait être liée au système nerveux périphérique. Par l'étude systématique du système nerveux autonome de patients atteints de MP, il montre que la distribution de corps de Lewy ne se limite pas au cerveau, mais ils sont également présents dans les noyaux des systèmes sympathiques, comme dans les ganglions sympathiques, et parasympathiques (DMV). Dans l'étude fine des plexus du SNE, il montre aussi la présence de ces inclusions dans les plexus digestifs, cardiaques et pelviens. Il en conclue que les systèmes nerveux autonome, central et périphérique, sont impliqués dans les processus pathologiques de la MP. Cet article, paru 10 ans avant la théorie du « double hit », met l'accent sur les systèmes nerveux périphériques dans la MP (Wakabayashi et Takahashi, 1997)

Après une période relativement creuse concernant les publications au sujet du système nerveux entérique et les corps de Lewy, Braak et son équipe publient un article en 2006 décrivant les inclusions intracytoplasmiques vues dans les plexus entériques de patient décédés de la MP sont elles aussi composées α-syn (Braak *et al.*, 2006). Après avoir publié sa classification des stades de la MP, cet article permet à Braak de préciser sa vision de la pathogenèse de la MP par l'interconnexion ininterrompue des neurones entériques et cérébraux. Analysant 5 patients parkinsoniens et 5 témoins asymptomatiques, Braak a pu détecter des inclusions de Lewy chez les 5 patients décédés de la MP, mais aussi chez 2 témoins exempts d'inclusions dans le cerveau, illustrant peut-être une phase précoce de la MP initiée dans l'intestin. Ceci soutient l'hypothèse selon laquelle un pathogène neurotrope

environnemental putatif pourrait être ingéré, celui-ci se transloquerait dans les plexus de Meissner puis d'Auerbach, et peut exercer son action neurotoxique directement dans le SNE. Les corps de Lewy ainsi formés pourraient rejoindre le cerveau au moyen d'une série consécutive de projections neuronales (Braak *et al.*, 2006). Cet article est précurseur à l'article exposant la théorie du « double hit » l'année suivante, décrivant « l'attaque » du cerveau par deux voies, la voie entérique et la voie olfactive (Hawkes *et al.*, 2007).

L'α-syn dans le système nerveux entérique

Depuis le retour de l'intérêt pour le système nerveux entérique avec les publications de Braak en 2002, 2006 et 2007, beaucoup d'équipes se sont intéressées à la présence d'α-syn pathologique dans les intestins de patients décédés ou par biopsies ponctionnée sur des patients vivants.

Notamment, une étude récente publié par l'Arizona Parkinson's Disease Consortium, a décrits la présence d'α-syn intestinale dans une grande majorité des cas de la MP. En effet, par l'étude de 41 sites différents dans une cohorte composée de 17 individus atteints de la MP, 23 témoins et d'autres individus décédés d'une MSA ou DCL, ces chercheurs ont montré la présence de l'α-syn phosphorylée dans le tractus digestif chez 11/17 patients, soit 65%, et dans la moelle épinière chez 16/17 patients. Dans le tractus gastro-intestinal, il semblerait y avoir un gradient rostro-caudal de diminution de la fréquence et de la densité d'α-syn phosphorylée en sérine 129, l'œsophage inférieur et les glandes submandibulaires ayant la plus forte densité et le côlon et le rectum ayant la plus faible densité en inclusions pathologiques (Beach *et al.,* 2010). D'autres études plus récentes ont montré la présence de l'α-syn pathologique dans le SNE où les patients parkinsoniens montrent le plus souvent une immunoréactivité beaucoup plus forte, par rapport à des individus témoins, tant pour l'α-syn normale que phosphorylée (Aldecoa *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2016; Kim, 2013; Sprenger *et al.*, 2015; Visanji *et al.*, 2014).

Analyse critique des biopsies entériques

La présence d'α-syn pathologique dans les intestins d'individus sains a déjà été attestée dans le cerveau et dans le SNE. Notamment, des corps de Lewy ont déjà été

retrouvés dans les troncs cérébraux de personnes ne présentant aucune pathologie parkinsoniennes ou apparentées et ayant plus de 60 ans (Klos *et al.*, 2006). Dans le SNE, une étude montre la présence α-syn dans les plexus gastrique et colique, détectée d'une manière similaire chez des patients atteints de MP ou de MSA mais aussi chez les témoins, ce qui suggère le rôle limité de α-syn en tant que biomarqueur entérique de la MP.

L'autre problème majeur des biopsies est la surface prise en compte. En effet, les synucléinopathies pourraient ne pas concerner la totalité des plexus entériques, menant donc à un biais expérimental lors du prélèvement de la biopsie. L'étude exhaustive de l'intestin d'un individu ne peut se faire que post mortem.

Pour résumer ce chapitre, l'intestin est un organe différent des autres par la présence d'un système nerveux tout le long de celui-ci, si développé qu'il lui vaut le nom de deuxième cerveau. La présence d'α-syn pathologique dans les plexus nerveux du SNE est fréquente et pourrait sous-tendre les désordres intestinaux observés dans la pathologie. Quelle que soit la théorie d'initiation de la MP considérée, toutes montrent des atteintes périphériques, notamment dans l'intestin. Le tractus digestif est en première ligne de l'exposition aux facteurs environnementaux ingérés ou respirés.

Parmi ces facteurs environnementaux, certains pesticides ont été montrés comme étant des facteurs de risques de la MP.

VI. Les pesticides et la MP

Un des chapitres précédents fait état du lien trouvé entre l'injection fortuite de 1-methyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) et le déclenchement précoce d'un syndrome parkinsonien. Étant donnée l'homologie structurelle entre le paraquat et le MPTP, ces grands titres médiatiques ont incité les chercheurs à mener des recherches sur le lien causal entre l'exposition à des pesticides et le déclenchement de la MP (Lewin, 1985).

Les pesticides

Définition réglementaire

Le terme « pesticide » couvre deux grandes catégories de produits : les biocides et les produits phytopharmaceutiques. Les biocides sont « destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique », alors que les produits phytopharmaceutiques sont définis comme les « produits, sous la forme dans laquelle ils sont livrés à l'utilisateur, composés de substances actives, phytoprotecteurs ou synergistes, ou en contenant, et destinés à (…) protéger les végétaux » (définitions du ministère de l'agriculture).

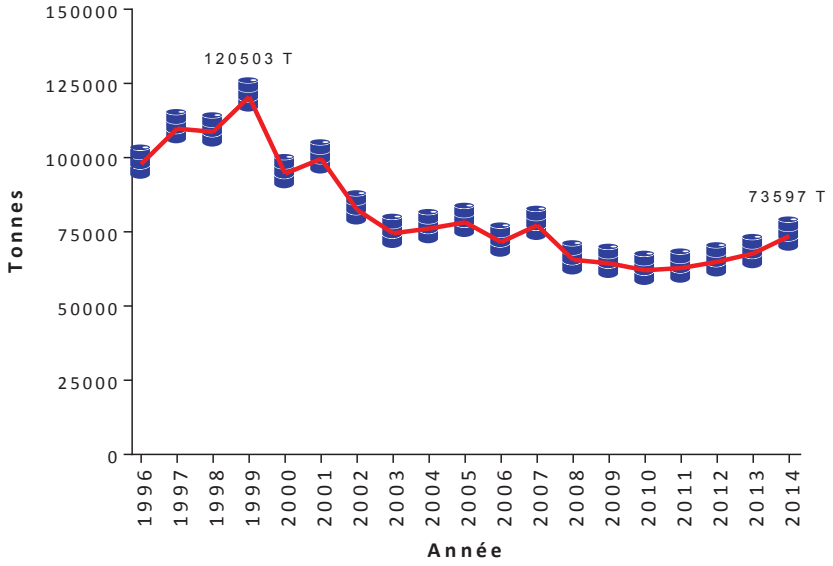


Figure 32: Données sur les quantités de pesticides vendues en France de 1996 à 2014. Sources UIPP et Banque nationale des ventes pour les distributeurs.

Les biocides comportent donc deux sous-catégories : les produits antiparasitaires (par exemple les insecticides, acaricides ou rodonticides) et les produits de protection, servant à traiter des surfaces telles que le bois ou des textiles. Les biocides sont réglementés par la directive CE 2012/528. Les produits phytopharmaceutiques sont réglementés par la directive européenne CE1107/2009 et regroupent par exemple les insecticides, herbicides, fongicides, molluscicides ou nématicides.

Usage des pesticides en France

La France possède la plus grande surface agricole d'Europe avec 28,98 millions d'hectares, devant l'Espagne et l'Allemagne. En termes d'achat de substances actives, la France était au 2eme rang européen en 2013 avec 66 659 tonnes, après l'Espagne (69 587 tonnes) et devant l'Italie (49 011 tonnes). L'évolution de la distribution de pesticides en France montre une forte baisse depuis la fin des années 1990, passant de 120 503 tonnes en 1999 à 62 065 t en 2010, soit une baisse de 48% en 10 ans. Depuis 2010, la distribution de pesticides est de nouveau en hausse, avec un poids total de pesticides vendus de 73 597 tonnes en 2014, soit une hausse de presque 20% en 4 ans, indiquée sur la Figure 32.

L'utilisation des pesticides est générale et permet la pérennité des infrastructures et le maintien de la salubrité dans un but de santé publique. Par exemple, en France l'un des plus gros utilisateurs de pesticides est la SNCF, dans le but d'entretenir et de pérenniser les voies ferroviaires et les ouvrages d'art. En 2012 la SNCF a utilisé 150 tonnes de pesticides pour l'entretien de ses 70 000 km du réseau ferré national. (Source SNCF Réseau, actualité du 10/09/2013).

Les pesticides ont été et sont toujours au cœur de plusieurs affaires sanitaires, notamment avec le scandale du chloredécone aux Antilles Françaises en 1993, ou avec les œufs contaminés au fipronil de l'été 2017. Ainsi des résidus de pesticides à l'état de traces sont continuellement retrouvés sur des aliments destinés à la consommation.

Les modalités d'exposition aux pesticides

L'exposition professionnelle

L'exposition professionnelle aux pesticides est la plus grande modalité d'exposition en France. Celle-ci touche plus de 5 millions de personnes selon la mutuelle sociale agricoles.

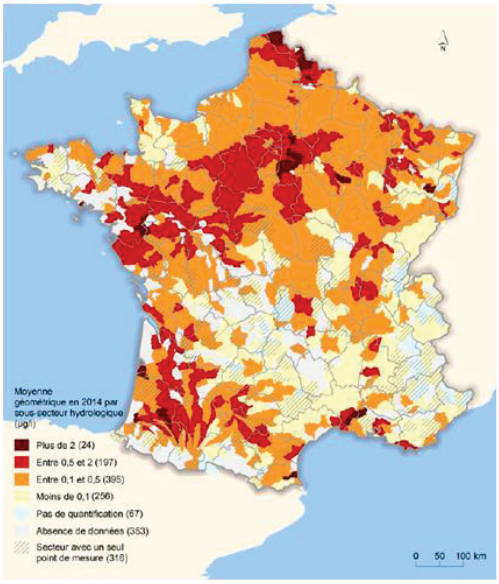
L'exposition professionnelle peut se séparer en 3 phases. La première concerne l'achat, le transport et le stockage. Dans cette modalité d'exposition le manutentionnaire, ou son véhicule, peut être mis en contact avec des substances chimiques vendues sous forme concentrée. Les emballages de substance chimiques, stockées sous forme de sacs ou de bidons, peuvent être altérées et mener à des fuites. La seconde phase d'exposition concerne la préparation, l'épandage et le nettoyage des appareils servant à leur application. En effet, tout pesticide nécessite la manipulation d'un produit commercial et ceci peut mener à des accidents impliquant là aussi une forte concentration de produit. Lors de l'épandage, deux facteurs sont à prendre en compte : la durée d'intervention et la dissémination en continu du pesticide proche de l'opérateur, celui-ci pouvant être mis en contact avec la substance appliquée sur diverses surfaces contaminées par le produit. La phase de nettoyage comporte aussi un risque de contamination, notamment par les projections d'eau ou par l'évacuation des eaux de lavage. La troisième phase d'exposition concerne la réentrée dans les cultures, celle-ci présente là encore une possibilité de mettre en contact l'opérateur avec les substances actives pulvérisées (Belsey *et al.*, 2011).

L'évaluation de l'exposition professionnelle dépend d'une multitude de paramètres propres à chaque type de cultures traitées, la surface de ces cultures, des équipements de protection individuelle portés, de l'expérience de l'opérateur ou encore de la machine de pulvérisation utilisée (Tielemans *et al.*, 2007). Cependant aucune variable globale ne permet de quantifier avec précision l'exposition d'un opérateur, de plus, aucune donnée ne peut définir une moyenne d'exposition générale à des substances chimiques.

L'exposition de la population générale

L'exposition de la population générale aux pesticides se fait principalement par l'alimentation, due à l'ingestion d'aliments ou de boisson présentant des résidus de pesticides (Oates et Cohen, 2011).

A



B

Échantillons	Échantillons contenant des résidus quantifiables	Échantillons non-conformes
Fruits	69,50%	0,9 % (essentiellement poires et fraises)
Légumes	36,60%	1,8 % (principalement céleris en branches, endives et manioc)
Légumineuses	44,20%	2,60%
Graines et fruits oléagineux	28,60%	3,60%
Thé, café, infusion	54,50%	9,10%
Épices	33,30%	1 échantillon
Céréales	60,80%	2 échantillons

Figure 33 : Les pesticides et la France. **A**. Infographie de ministère de l'agriculture concernant la contamination des eaux de surface par des résidus de pesticides. **B**. Étude sur l'alimentation totale EAT menée par l'ANSES étudiant les résidus de pesticides sur l'alimentation et leur respect des normes sanitaires.

À titre d'exemple, la présence de pesticides en France sous forme de traces est généralisée. Selon le commissariat général au développement durable, 91 % des points de contrôle en des eaux de surface (lacs et rivières) présentent des traces de pesticides (Figure 33 A). Le captage de ces eaux de surface puis leur traitement pour l'alimentation du réseau de distribution mène à une distribution de ces pesticides par l'eau de ville. Cependant le code de la santé publique (article R.1321-2) fixe la concentration de pesticide maximale 0.5 µg/L et la concentration maximale pour chaque pesticide à 0.1 µg/L. Au cours de l'année 2014, 3,86 millions d'habitants (soit 6,0 % de la population française), ont été alimentés par de l'eau du robinet au moins une fois non-conforme, dépassant les limites légales en termes de concentration en pesticides. (Bilan de la qualité de l'eau au robinet du consommateur vis-à-vis des pesticides en 2014, Ministère de la santé). Cette exposition par l'eau de distribution touche donc plusieurs millions de personnes en France.

L'autre aspect de l'exposition générale des populations se présente par l'ingestion de fruits et légumes contenant des traces de pesticides (Barnat *et al.*, 2010). Dans son l'étude sur l'alimentation totale (EAT, 2011), l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) présente un rapport d'expertise concernant la présence de résidus de pesticides dans 194 aliments de consommation courante. 283 produits phytosanitaires ont été choisis sur des critères d'enjeux dans l'évaluation des risques pour différentes substances ou par la description de l'évolution dans le temps des expositions. Sur les 283 substances actives recherchées, 62 sont classées prioritaires en termes de surveillance dans l'exposition alimentaire, dans le cadre des travaux de l'Observatoire des résidus de pesticides. Les résultats montrent une absence de risque d'exposition chronique pour 96% des substances évaluées. Subséquemment, 4% des substances évaluées sont donc possiblement contributrices à l'exposition générale de la population. Ces substances sont : Dithiocarbamates, Ethoprophos, Carbofuran, Diazinon, Méthamidophos, Disulfoton, Dieldrine, Endrine, Heptachlore (Bechaux *et al.*, 2013). Dans cette étude, la substance présentant le plus grand risque de dépassement des limites réglementaires est le diméthoate, autorisé avant l'étude en tant qu'insecticide pour le traitement des vignes, des cultures fruitières et légumières. Depuis les conclusions de l'étude, ce pesticide a été interdit en France, en 2016.

Une autre voie d'exposition possible de la population générale est la riveraineté avec des exploitations agricoles par la dissémination aérienne de résidus de pesticides. Plusieurs études ont montré la présence de résidus de pesticides dans les poussières présentes à l'intérieurs des habitations riveraines de champs, et ce jusqu'à plus d'un kilomètre de distance par rapport au champ (Quiros-Alcala *et al.*, 2011).

Ces trois exemples d'exposition alimentaire à des pesticides, par l'eau de distribution, par l'alimentation et dans les poussières à l'intérieur des domiciles montrent qu'il existe une exposition chronique et à faible dose de toute la population française à des produits phytosanitaires.

Liens entre pesticides et MP

Après plus de trois décennies de recherche concentrant la toxicité potentielle des pesticides et leurs liens avec la MP, beaucoup d'études épidémiologiques s'accordent sur le lien causal entre l'exposition à des pesticides et le déclenchement précoce de la MP (Elbaz *et al.*, 2009; Firestone *et al.*, 2005; James et Hall, 2015; Tanner, 2010; van der Mark *et al.*, 2012; van der Mark *et al.*, 2014; Vanacore *et al.*, 2002). D'ailleurs, depuis 2012, la MP est reconnue comme maladie d'exposition professionnelle par la mutuelle sociale agricole.

Parmi les pesticides incriminés, deux pesticides principaux ont été liés épidémiologiquement avec le déclenchement précoce de la MP : la roténone et le paraquat (Spivey, 2011; Tanner *et al.*, 2011). Seuls ces deux pesticides seront développés dans cette thèse.

Roténone

La roténone est un pesticide naturel isolé dans plusieurs espèces végétales, telle que la *Paraderris elliptica* en Asie ou le bois poison en Afrique, vu sur la figure 34.

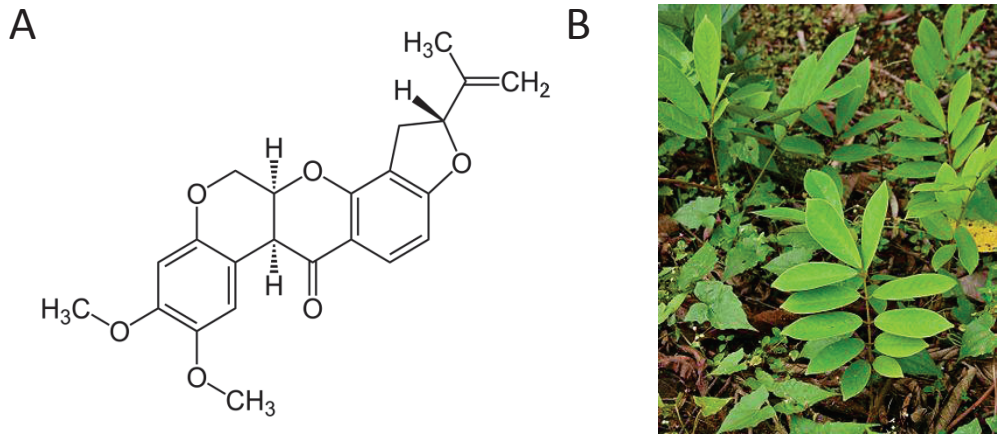


Figure 34 : La roténone. **A**. Structure chimique de la roténone. **B**. La plante *Paraderris elliptica*, espèce dont peut être extraite la roténone.

La roténone est un insecticide naturel, autorisé en agriculture biologique jusqu'en avril 2008 date à laquelle la commission européenne demande à tous les états membres de retirer les AMM des formulations contenant cette substance. En France, une dérogation d'usage pour l'agriculture biologique a persisté jusqu'en avril 2011, date de l'interdiction

totale de la roténone en France. La cause de l'interdiction de la roténone est essentiellement due à ses effets sur l'homme, notamment concernant l'altération de la fertilité, sa toxicité pour l'embryon durant la grossesse et sa mise en cause dans la maladie de Parkinson.

Depuis son interdiction, il est peu probable que la roténone soit encore un contributeur majeur dans la pathogenèse des cas idiopathiques de la MP. Cependant, les mécanismes de la toxicité de cette molécule sont assez bien définis et l'étude de ceux-ci a permis de mieux comprendre certains mécanismes impliqués dans la perte de neurones dopaminergiques. Ceci montre l'intérêt des études utilisant des pesticides interdits mais considérés comme référentiels, d'une part pour caractériser des modèles d'exposition et d'autre part pour étudier les mécanismes de déclenchement de la maladie. Par ses propriétés particulièrement hydrophobes, la roténone à la faculté de traverser facilement la BHE (Hernandez-Romero *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2015), cet insecticide peut donc exercer son action neurotoxique directement dans les structures cérébrales.

Paraquat

Le paraquat est un herbicide de synthèse non sélectif ayant longtemps été l'herbicide le plus utilisé dans le monde (Yu *et al.*, 2007). Il est encore utilisé dans plus de 100 pays et son utilisation alternative est en plein essor dans certains pays où des végétaux ont développé une résistance au glyphosate, notamment aux États-Unis (Sammons et Gaines, 2014).

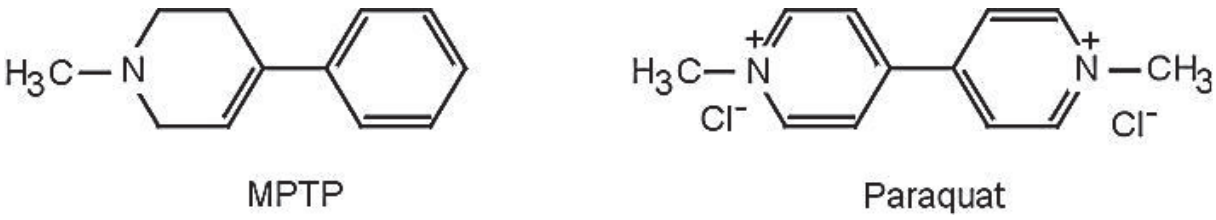


Figure 35 : Structure du MPTP et du paraquat. Les deux molécules partagent une certaine homologie

Le paraquat (N, N'-diméthyl-4-4'-bipyridium), aussi appelé dichlorure de paraquat ou méthyl viologène, est un composé extrêmement soluble (620 g/L), ce qui rend son utilisation

en recherche particulièrement aisée. C'est une molécule analogue au MPTP, comme il est visible sur la figure 35, et il a été associé étiologiquement au déclenchement de la MP par des études épidémiologiques (Firestone *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012; Tanner *et al.*, 2011).

Pour ce qui est de la réglementation de ce produit, il est interdit en Europe et en France depuis 2007, par l'avis publié dans le journal officiel du 4 Aout 2007, retirant l'autorisation de mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques contenant du paraquat (R BIX (AMM n° 8700169)). Alors que l'Europe a banni ce pesticide, celui-ci est encore utilisé dans plus d'une centaine de pays de par le monde, notamment aux États Unis, où son usage est non seulement encore autorisé, mais en dix ans son utilisation a été multipliée par 4, atteignant plus de 3000 tonnes en 2015. (Article du 21 décembre 2016 publié dans le New York Times https://www.nytimes.com/2016/12/20/business/paraquat-weed-killer-pesticide.html?_r=0)

D'autres pays ont banni le paraquat car un des usages détournés de ce pesticide est en tant qu'agent de suicide, une simple gorgée de ce pesticide suffit à déclencher un décès par fibrose pulmonaire en 20 jours (Xie *et al.*, 2012). Par exemple, la Corée du Sud a connu un déclin du nombre de suicide de 10% l'année suivant l'interdiction du paraquat (Myung *et al.*, 2015).

Mécanismes de toxicité du Paraquat

Suite aux études épidémiologiques liant le paraquat à la MP, des équipes ont cherché à comprendre par quel(s) mécanisme(s) biologiques(s) cette substance pouvait être neurotoxique.

Le paraquat est très toxique pour le système respiratoire et est faiblement métabolisé lors d'une ingestion car il est retrouvé sous sa forme initiale dans les urines (Tanner *et al.*, 2011). Des études se sont intéressées sur le devenir du paraquat une fois injecté chez la souris, ainsi le paraquat peut traverser la BHE et atteint le cerveau (Corasaniti *et al.*, 1998). Ceci pourrait être un élément déterminant du lien existant entre le paraquat et la MP car, en plus d'atteindre le cerveau, il se produit une bioaccumulation du paraquat

dans cet organe. Dans le cerveau, sa demi-vie est de 4 semaines, suivant une seule injection i.p. à la concentration de 10 mg/kg (Prasad *et al.*, 2007).

Les mécanismes de toxicité du paraquat impliqueraient 3 voies : le métabolisme de la dopamine, le stress oxydatif et la formation d'agrégats d'α-syn.

Le paraquat et la dopamine

La bioaccumulation du paraquat dans le cerveau pourrait impliquer un transport actif par les canaux sodiques afin de traverser la BHE (McCormack et Di Monte, 2003). Le paraquat cible spécifiquement les neurones dopaminergiques et induit une perte neuronale. Dans des modèles murins, il est montré que l'administration de paraquat par voie intrapéritonéale induit une dégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques (Kachroo *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2005). Cette perte neuronale pourrait être due à l'implication d'un transporteur de la dopamine. En effet, dans un modèle murin, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif du transport de la dopamine réduit l'absorption du paraquat (Shimizu *et al.*, 2003), et le blocage du transporteur classique de la dopamine (DAT, Dopamine Transporter), protège spécifiquement dans un modèle cellulaire (Yang et Tiffany-Castiglioni, 2005). Cependant, le lien entre le paraquat et la perte de neurones dopaminergiques est contestée. En effet, une équipe financée par Syngenta, firme commercialisatrice des mélanges comportant du paraquat, contredit les précédentes études sur les effets du paraquat et montre dans une étude que les neurones dopaminergiques ne sont pas touchés lors de l'exposition de souris par voie alimentaire au paraquat (Breckenridge *et al.*, 2013; Minnema *et al.*, 2014).

Une hypothèse intéressante et assez peu reprise dans les recherches récentes serait que la toxicité spécifique du paraquat envers les neurones dopaminergiques pourrait être due à l'homologie structurelle existant entre la dopamine et le paraquat. En effet, cette homologie structurelle entre le paraquat et le MPTP a déjà été évoquée, mais l'élément intéressant est que ces deux molécules s'apparentent aussi à la dopamine, sans être parfaitement homologues (Jakowec et Petzinger, 2004; Lewin, 1985), comme il est vu sur la Figure 36. Ainsi, lorsque le paraquat est ingéré et qu'il est transporté par voie systémique

jusqu'au cerveau où il traverse la BHE, le paraquat pourrait-être capté par les récepteur à la dopamine, ce qui expliquerait sa toxicité sélective envers ce type de neurones.

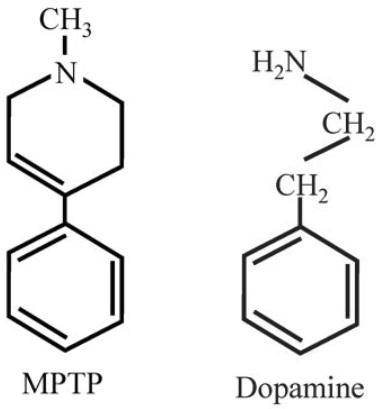


Figure 36 : Comparaison structurelle entre le MPTP et la dopamine, adapté de (Jakowec et Petzinger, 2004)

Stress oxydatif

Le paraquat serait toxique par l'induction d'un stress oxydatif dans la cellule par la création de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species), réaction décrite dans la figure 37. Par l'oxydoréduction du paraquat, l'ion paraquat^{2+} capte un électron réducteur par la chaîne respiratoire mitochondriale et créé un anion superoxyde $O^{2-\bullet}$, un ROS. Ceci permet au paraquat de se régénérer, et peut ainsi recommencer ce cycle, créant ainsi des ROS de façon continue (Mohammadi-Bardbori et Ghazi-Khansari, 2008).

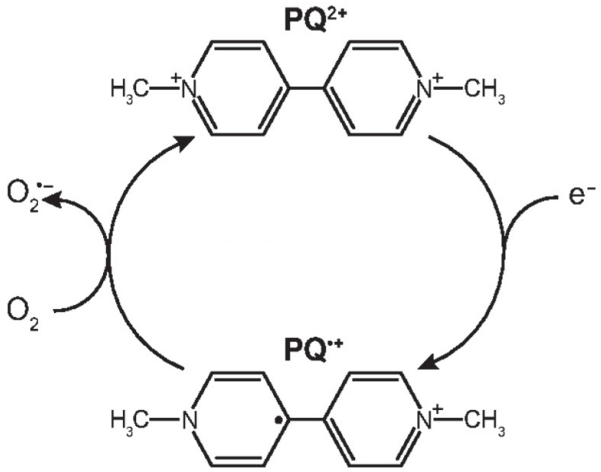


Figure 37 : Voie de création des ROS par le paraquat, induisant un stress oxydatif généré en continue dans la cellule. Adapté de (Cocheme et Murphy, 2008).

Ce stress oxydatif ainsi créé interfère avec le transport d'électrons dans la mitochondrie, particulièrement dans la SN, ceci inhibe le Complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi montré dans des modèles *in vitro* (Cocheme et Murphy, 2008; Richardson *et al.*, 2005). Cependant, l'inhibition du Complexe 1 par le paraquat pourrait ne pas être la cause des pertes de neurones dopaminergiques, comme il a été montré par Choi et collègues dans un modèle transgénique de souris déficiente en une protéine nécessaire à la fonction du Complexe I, où le paraquat induit quand-même une perte de neurones dopaminergiques dans ces souris (Choi *et al.*, 2008).

Formation d'agrégats d'a-synucléine

L'autre aspect relevant des effets du paraquat sur les neurones est la formation d'agrégats d'α-syn, cependant les mécanismes réels d'induction de l'expression de l'α-syn sont encore assez peu connus. Plusieurs études ont montré *in-vivo* que l'administration de paraquat pouvait induire une synucléinopathie, notamment dans le striatum de souris C57Bl/6 après injection systémique (Wills *et al.*, 2012). Dans le modèle murin Thy1, surexprimant l'α-syn humaine, l'injection systémique de paraquat induit une augmentation de l'agrégation de la protéine et la résistance à la protéinase K (Fernagut *et al.*, 2007). Aussi, toujours dans un modèle *in-vivo*, il est montré que le paraquat mène à la formation d'agrégats contenant de l'α-syn dans la substance noire, parallèle à l'augmentation (réversible) de la concentration cellulaire en α-syn (Manning-Bog *et al.*, 2002). Un élément original est rapporté par Uversky et collègues où il montre *in vitro* que le paraquat accélère la formation de fibrille (Uversky *et al.*, 2001). Cependant il n'y aurait pas de fixation directe entre le paraquat et l'α-syn, comme l'indique une étude *in* vitro portant sur de l'α-syn recombinante, indiquant que les effets du paraquat dans la MP ne seraient pas dus à une interaction directe avec α-syn, renforçant l'idée que son rôle est limité à l'inhibition du Complexe I mitochondrial (Maturana *et al.*, 2015).

Pour résumer ces trois aspects de la toxicité du paraquat, depuis son entrée dans l'organisme jusqu'à l'induction d'un stress oxydatif dans la mitochondrie, les mécanismes associés à cette toxicité semblent être élucidés, cependant le lien entre le paraquat et l'augmentation de l'α-syn *in-vivo* et *in-vitro* reste encore à être clarifié. Le paraquat est donc un oxydant fort pour l'organisme. Le fait que cette molécule soit elle aussi considérée

comme une molécule de référence dans les études sur la MP justifie son utilisation pour étudier les mécanismes d'initiation de la pathologie.

Contexte et objectifs du doctorat

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente en France, après la maladie d'Alzheimer. Cette maladie se traduit par des tremblements incontrôlables et continus, symptôme le plus visible de la maladie. D'un point de vue biologique, la MP appartient à la famille des synucléines, comportant la MP, la DCL et la MSA. Ces maladies ont le point commun d'être causées par l'α-syn, protéine neuronale dont les fonctions précises restent encore à être déterminées distinctement. Cette protéine fait partie intégrante du contexte de la thèse présentée ici. La MP, les autres synucléinopathies et une majorité des maladies neurodégénératives se caractérisent par une longue phase latente exempte de symptômes moteurs. Pour les synucléinopathie, durant cette période l'α-syn est au centre des processus pathologiques.

La MP possède une évolution lente, dont les premiers symptômes moteurs caractéristiques apparaissent tardivement, une à deux décennies après l'initiation potentielle de la maladie. Particulièrement, dans cette maladie des pertes de neurones dopaminergiques sont observées dans la substance noire, une aire cérébrale impliquée dans l'inhibition du mouvement. On estime donc que les premiers symptômes moteurs apparaissent lorsque plus de 70 % de cette zone cérébrale est détruite, à un stade où le cerveau est ainsi particulièrement touché. Des pesticides ont été montrés comme pouvant mener spécifiquement à la perte de neurones dopaminergiques et ces substances ont été liées épidémiologiquement au déclenchement de la MP. Ainsi, le paraquat et la roténone ont été montrés comme pouvant être liés au déclenchement de syndromes parkinsonien chez des agriculteurs utilisant ces pesticides. Depuis, cet effet neurotoxique a été attesté par beaucoup d'études faisant de ces deux substances des pesticides de référence dans l'étude des synucléinopathies. Cependant, les effets précis de ces pesticides sur le compartiment nerveux présent dans l'intestin sont encore peu étudiés.

Le titre initial du projet de thèse financé par le dispositif ARC 3 de la région Auvergne Rhône Alpes est « *Étude de l'implication du système nerveux périphérique dans le déclenchement d'une α-synucléinopathie centrale : approche comparée d'exposition alimentaire à des pesticides dans différents modèles murins de maladie de Parkinson* ». Les objectifs de cette thèse sont donc d'explorer les effets de l'exposition par voie orale au paraquat, herbicide considéré comme une molécule de référence dans l'étude des synucléinopathies, dans différents modèles murins, sauvages et transgéniques. Particulièrement, l'effet du paraquat sera investigué dans deux systèmes nerveux : le SNC et le système nerveux présent dans l'intestin, désigné comme SNE. Aussi, dans ce travail, seule la voie d'administration orale est utilisée à une dose relativement faible pour se rapprocher le plus possible des conditions d'absorption de pesticides par l'homme.

Deux objectifs majeurs lient ces travaux de thèse avec les thématiques de l'Agence Nationale de la Santé et de Sécurité Sanitaire, Alimentation Environnement Travail (ANSES) sont identifiés ici. Le premier est un objectif scientifique où les thématiques abordées permettent d'investiguer les effets de l'ingestion d'un pesticide considéré comme neurotoxique sur l'α-syn présente dans le SNE et dans le SNC. Le deuxième objectif est un objectif de santé publique, ayant pour but à plus long terme de créer une base méthodologique appliquée à l'évaluation de substances chimiques.

Ce projet s'articule autour de 3 parties :

1. **La mise en place d'un modèle d'exposition aux pesticides par voie orale chez la souris.**

La première partie de la thèse a porté sur le choix et la mise en place d'un modèle d'exposition orale de souris à un pesticide, le paraquat. Ainsi, deux modes d'administration ont été testés à différentes doses : le gavage intragastrique et l'administration par l'eau de boisson. Les résultats acquis ont mené au choix de l'administration du pesticide par l'eau de boisson dans la suite des expérimentations, en se basant sur la faible mortalité et l'excellente tolérance de cette voie d'administration.

2. **L'étude histologique de l'induction de l'α-synucléine phosphorylée dans l'intestin de souris transgéniques exposées au paraquat.**

Fort de la sélection de l'administration du paraquat par l'eau de boisson, le projet de thèse s'est poursuivi par l'étude par immunohistochimie de coupes de cerveaux et d'intestins de souris sauvages et transgéniques présentant une synucléinopathie spontanée. Des données précédentes montrent que ces souris transgéniques présentent des dépôts d'α-syn phosphorylée à partir de 3,5 mois d'âge dans le SNE et dans le cerveau simultanément (Bencsik *et al*., 2014). Nous avons donc exposé des souris TgM83 pendant 6 à 8 semaines au paraquat par l'eau de boisson et des souris C57Bl/6 pendant 6 semaines. L'étude des intestins et des cerveaux des souris TgM83 montre que l'exposition au paraquat accélère l'apparition de cette synucléinopathie par la détection de la protéine phosphorylée dans le système nerveux entérique de ces souris dès 3 mois d'âge, cependant cette accélération n'est pas constatée dans le cerveau aux temps étudiés. Dans la lignée C57Bl/6, les 6 semaines d'exposition au pesticide par voie orale n'engendrent pas l'apparition de dépôts d'α-syn phosphorylée dans le compartiment nerveux de l'intestin cependant une gliose réactionnelle est attestée par la surexpression de la GFAP dans ces intestins.

3. L'étude biochimique des modulations des niveaux d'α-synucléine induites par l'exposition orale au paraquat chez la souris sauvage et transgénique.

Pour aller plus loin dans la compréhension des modifications biologiques induites par l'exposition à un pesticide, la thèse s'est poursuivie par l'étude topographique, région par région, des niveaux d'expression de l'α-syn en conditions physiologiques et en conditions de stress oxydatif induit par l'exposition au paraquat, tant dans les aires cérébrales que dans l'intestin. Ainsi, la mise au point des techniques biochimiques d'extraction et d'analyse de l'α-synucléine totale à partir d'échantillons intestinaux a permis de montrer l'augmentation globale des niveaux d'α-synucléine tant dans le système nerveux entérique que dans le système nerveux central suivant une exposition au paraquat.

L'ensemble des résultats originaux présentés dans cette thèse s'inscrit dans le but d'avoir une meilleure compréhension de l'effet d'un pesticide, le paraquat, sur différents système nerveux par une approche originale d'exposition orale, plus proche des modalités d'exposition de la population générale. Aussi, en lien avec les missions du laboratoire ANSES de Lyon, la mise en place d'un modèle d'exposition à des produits phytosanitaires pourrait servir de base à l'évaluation des risques toxicologiques pour d'autres substances chimiques, en lien avec les synucléinopathies.

Résultats expérimentaux

Dans cette partie 3 productions scientifiques seront détaillées :

Poster présenté au Xème congrès de la société des neurosciences

1 *Neurodegenerative model in mice induced by chronic oral exposure to pesticide: comparative study between drinking water and intra-gastric administration*

Article 1 : Publié dans Journal of Neuropathology & Experimental Neurology

2 *Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α-Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α-Synuclein Transgenic Mice*

Article 2 : Soumis dans le journal Neurotoxicology

3 *A widespread increase of α-synuclein expression in the brain and intestine of mice chronically exposed to paraquat through drinking water*

1 Neurodegenerative model in mice induced by chronic oral exposure to pesticide: comparative study between drinking water and intra-gastric administration

Nicolas Naudet, Emilie Antier, Damien Gaillard, Eric Morignat, Latifa Lakhdar, Christel Vanbesien, Anna Bencsik

Résumé des données présentées par poster au XIème congrès de la Société Française des Neurosciences à Montpellier en mai 2015.

Dans la première partie du travail, les expérimentations ont porté sur la détermination de la « meilleure » voie d'exposition orale et chronique au paraquat, comprenant une excellente tolérance et un respect du bien-être animal. Ces résultats apparaissent uniquement dans un poster présenté au XIème congrès de la société des neurosciences.

Ainsi, pour déterminer cette voie d'exposition orale, deux modes d'administration ont été testées :

Le gavage intragastrique

Le gavage intragastrique correspond à l'administration d'une quantité précise d'une solution de pesticide directement dans l'estomac de la souris à l'aide d'une sonde de gavage. Cette technique est lourde, tant pour l'opérateur que pour la souris. En effet, ce mode d'administration est astreignant et très lourd sur le plan éthique car il impose une manutention quotidienne de tous les animaux des lots exposés, mais aussi des lots contrôles, étant eux aussi soumis à l'administration d'eau par voie intragastrique. Ceci représente pour l'opérateur une charge de travail particulièrement conséquente nécessitant un savoir-faire et une précision dans l'exécution du gavage. Aussi, cette méthode invasive induit un stress conséquent à l'animal. Outre le fait que cette voie soit contraignante, elle présente l'avantage de proposer un parfait contrôle de la dose quotidienne administrée à la

souris, cependant cette dose est distribuée de façon relativement « aigue » tous les jours, les souris n'ayant qu'une seule prise de pesticide quotidienne.

La dilution du paraquat dans l'eau de boisson

L'administration du paraquat par la dilution de celui-ci dans l'eau de boisson est une voie d'exposition simple, adaptée à ce pesticide car il est extrêmement soluble. Les souris consomment l'eau additionnée de la substance sélectionnée. Contrairement au gavage intragastrique, ce mode d'administration n'est pas astreignant car il ne nécessite aucune manutention de la souris. De ce fait la souris ne subit aucun stress lié à la manutention et au gavage. L'un des points négatifs de ce mode d'administration concerne la dose ingérée par la souris. En effet, cette dose de pesticide ne peut être qu'estimée, en multipliant la quantité théorique d'abreuvement par la concentration présente dans l'eau de boisson. L'avantage de cette voie d'administration est la répartition de la dose sur la journée, à l'inverse du gavage intra gastrique.

Dans une première série d'expérimentations, les deux voies d'administration ont été testées sur plusieurs lots de 6 souris. Le gavage intragastrique a été testé à 3 doses différentes : 5, 10 et 20 mg/kg/jour pendant 6 semaines alors que l'exposition par eau de boisson a été testée à la dose de 10mg/kg/jour, correspondant à une concentration de 50 µg/mL dans l'eau d'abreuvement, pendant 6 semaines. Un suivi quotidien des souris exposées a été assuré, comprenant l'observation de l'état général des souris ainsi que la pesée. Aussi, des tests Rotarod ont été réalisés de façon hebdomadaire afin de voir si des déficits moteurs sont induits par l'exposition orale au paraquat.

Les résultats de ces tests préliminaires indiquent que l'administration par l'eau de boisson est parfaitement tolérée, avec un poids stable et aucune perte d'individus. A l'inverse, l'administration par gavage mène à plusieurs éléments problématiques dans les deux plus fortes doses testées dans notre étude. Le premier élément étant une perte de poids d'environ 3 à 5 grammes des souris exposées dans les premières semaines d'exposition. Le deuxième élément étant une mortalité concernant 33 % des individus aux deux plus fortes doses, dans les premières semaines d'exposition. Seule la dose la plus faible, à savoir 5 mg/kg, n'engendre aucune perte de poids et aucune mortalité. Les analyses par test Rotarod ne montrent aucune différence entre les lots exposés et les lots témoins

pour les deux modalités d'exposition testées ici, indiquant qu'il n'y a aucune altération motrice induite par le paraquat aux doses et aux temps étudiés.

Dans cette présentation, des tests étudiant la TH et la GFAP dans les cerveaux de ces souris ont été amorcés par la quantification numérique de marquages immunohistochimiques avec des anticorps anti-TH et anti-GFAP. Cependant ces marquages portaient seulement sur une coupe de substance noire, alors que l'analyse rigoureuse de la quantité de TH dans un cerveau se fait par une analyse stéréologique, exhaustive de toute la SNpc. Ces résultats ne sont pas pris en comptes dans la thèse présentée ici.

En conclusion, à doses équivalentes de 10 mg/kg/jour, l'administration du pesticide par l'eau de boisson est parfaitement tolérée, alors que l'administration par gavage intra-gastrique mène à des pertes d'individus, couplé à une administration du pesticide affectant considérablement le bien-être animal.

NEURODEGENERATIVE MODEL IN MICE INDUCED BY CHRONIC ORAL EXPOSURE TO PESTICIDE: COMPARATIVE STUDY BETWEEN DRINKING WATER AND INTRA-GASTRIC ADMINISTRATION

Naudet N.[1], Antier E.[2], Gaillard D.[2], Morignat E.[3], Lakhdar L.[2], Vanbesien C.[4,5], Bencsik A.[1]

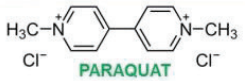
[1] Neurodegenerative Disease Unit, [2] PFEA Unit, [3] Epidemiology Unit, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses), Lyon, France
[4] Inserm UMR-S 1172, JPArc, Team "Early Stages of Parkinson's Disease", IRCL, Lille, France, [5] Université Lille Sciences & Technologies, Dpt of Neurosciences, Villeneuve d'Ascq, France

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease after Alzheimer's and constitutes a true burden for the aging population. Most cases are sporadic and a multifactorial etiology involving genetic and environmental factors is acknowledged. Among environmental factors, pesticides were identified as being related to PD cases in particular after occupational exposure, but it remains poorly understood when and how pesticides could participate to the pathogenesis of PD. Rodent models of pesticide exposure by oral route mimic well the development of the disease which can be followed by the progressive expression of the main hallmark of PD, alpha-synuclein (αSYN) aggregates within the nervous system as well as other markers such as neuroinflammation through reactive gliosis or neurodegeneration through dopaminergic loss.

In that context, the aim of this pilot study is to compare intra-gastric and drinking water exposure to pesticide on the induction of neurodegenerative processes in the central nervous system in order to prepare longer experiments programmed to study the impact of chronic pesticide exposure.

MATERIALS & METHODS



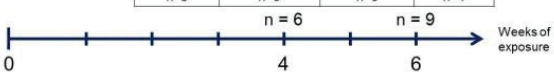
Most widely non-selective herbicide used in the world. Soluble and stable in water, with great persistence in soil and water table. May contaminate fruits, vegetables and tap water. Forbidden in France since 2007. Acute intoxication leads to respiratory distress, kidney failure and death. Chronic intoxication lead to bioaccumulation in several organs (brain, kidney, liver, lung) and lung fibrosis. May pass through blood brain barrier. Neurototoxic effects: oxidative stress in mitochondria of dopaminergic (DA) neurons, leads to cell death. PQ is associated to PD (epidemiological studies in farm workers). PQ used in rodent as models to explore mechanisms of PD triggering, DA neurons depletion, αSYN aggregation (PD-like lesion) within the brain. (Prasad et al., 2009, Berry et al., 2010, Mandel et al., 2011).

INTRA GASTRIC

Forced feeding 5 days a week, 200 µL during 6 weeks

	Low dose (l)	Middle dose(M)	High dose (H)	Control
Paraquat	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	water
	n=3	n=6	n=6	n=4

C57BL6 Mice
8 weeks old
(average weight: 17g)



Rotarod apparatus
Two tests weekly :

- Acceleration: 2 min run up to 40 rpm
- Endurance: 5 min run at 20 rpm

3 repeated measurements / mouse / test

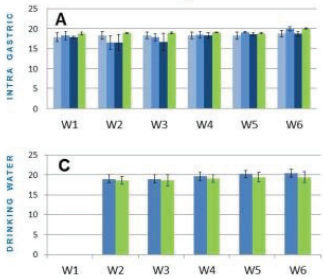
DRINKING WATER

Drinking water *ad libitum* n = 6 + 2 ctrl

Paraquat : 50 µg/mL during 6 weeks
(corresponding to roughly 10 mg/kg daily intake)

RESULTS

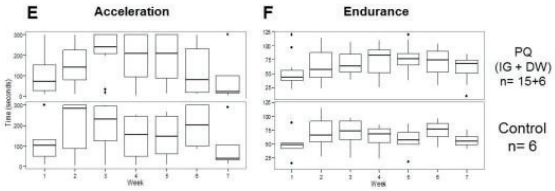
Weight



Survival

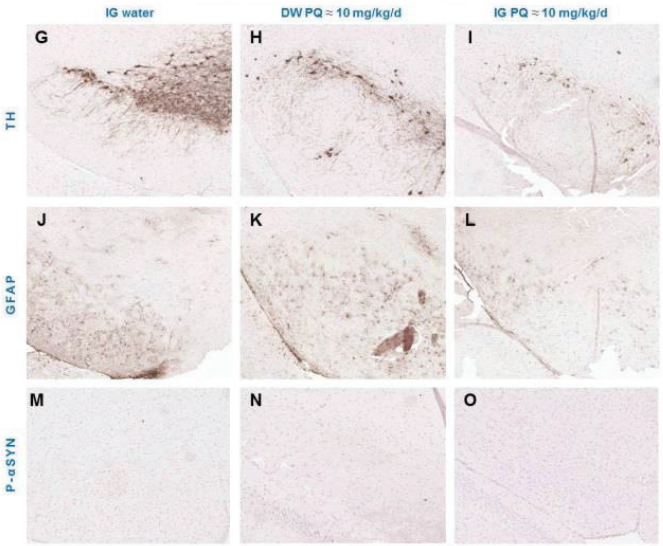
Effect of chronic paraquat oral intake on mice weight and survival. Loss of weight within the first weeks of exposure leading sometimes to death (B). Appears to be dose dependent. No loss in drinking water group. (**A-C**): mean of the weight of all mice, daily weighted.(**B-D**): Survival curves, expressed in percentage of surviving mice.

Rotarod tests



Rotarod tests are performed to detect locomotor deficiency: Due to low number of mice (pilot study) all PQ exposed mice were grouped (Intra gastric (IG) + drinking water (DW)), as for controls. Data reveal high heterogeneity inter and intra groups during the time dependent study. No statistical differences between exposed and controls could be observed. (**E**) Acceleration test, (**F**) Endurance test.

Earliest histopathological studies in substantia nigra



Preliminary results reveal apparent DA neuron loss and reactive gliosis in Substantia nigra (SN) after six weeks of exposure. Tyrosine hydroxylase (TH), Glial Fibrilary Acid Protein (GFAP) and Phosphorylated Alpha-Synuclein (P-αSYN) immunohistochemistry staining. PQ exposure appears to affect DA neurons, induce reactive gliosis, for both ways of exposure, in the SN. No αSYN phosphorylation. (**G-J-M**) control mouse. (**H-K-N**) mouse exposed to PQ through drinking water (50 µg/mL). (**I-L-O**) mouse exposed to PQ by intra-gastric route (10 mg/kg/d).

CONCLUSION

The first observations indicate a better tolerance of PQ administration through drinking water. Compared to intragastric exposure with a comparable dose of exposure, PQ administration through drinking water allows normal gain of weight and avoid mortality. Rotarod tests reveal high individual variability whatever the group and after 6 weeks of chronic exposure to PQ no significant locomotor defects could be detected. First histopathological data show a possible early dopaminergic neurons loss in the SN in addition to reactive gliosis in mice exposed during 6 weeks to PQ, by intra-gastric route and through drinking water as well. Also, these observations will be comforted with precise quantification of TH signals in order to study a possible dose dependant effect on DA loss. Still the pilot study already show the possibility to use drinking water as way of PQ administration in longer studies programmed to mimic more complete neurodegenerative process.

References *: Prasad K. et al., journal of experimental neurology, 2009. Berry C. et al., Cell death and differenciation, 2010. Mandel JS. et al., Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2011.*
Acknowledgements : Authors are grateful to Région Rhône Alpes for the PhD granting of N. Naudet.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ANSES Lyon, Unité Maladies Neurodégénératives

2 Article N°1 : Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α-Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α-Synuclein Transgenic Mice

Nicolas Naudet, Emilie Antier, Damien Gaillard, Eric Morignat, Latifa Lakhdar, Thierry Baron et Anna Bencsik

Résumé des résultats publiés dans Journal of Neuropathology and Experimental Neurology (JNEN) – Publié le 12 octobre 2017

Naudet et al., 2017 – doi : 10.1093/jnen/nlx092

Ce premier article de thèse a pour but d'étudier les effets du paraquat administré par voie orale dans deux compartiments nerveux distincts : le cerveau et l'intestin. Dans cet article, deux lignées murines ont été exposées au paraquat, la souris TgM83 et la souris sauvages C57Bl/6.

Ainsi dans cet article, ayant choisi l'exposition au paraquat par l'eau de boisson, des souris jeunes, âgées de 8 semaines d'âge, ont été exposées par l'eau de boisson à ce pesticide à la dose de 10 mg/kg/jour pendant 6, 7 ou 8 semaines.

La souris TgM83 est une souris transgénique exprimant la protéine α-syn humaine mutée au niveau du résidu 53 sur la protéine où une alanine devient une thréonine (A53T), mutation retrouvée dans les cas familiaux de la MP. La protéine exprimée dans ces souris comporte donc une mutation au niveau de la deuxième hélice α présente dans la structure de la protéine.

Les souris de la lignée TgM83 développent spontanément une synucléinopathie dont les symptômes moteurs sont caractérisés, dans cette lignée murine, par l'apparition à partir de 8 mois d'une rigidité du train arrière associée à une démarche présentant des membres inférieurs « fuyants » lors des déplacements. Une publication précédente émanant de notre

laboratoire a permis de montrer que cette pathologie se traduit par l'apparition de la forme phosphorylée de l'α-syn en sérine 129 dans le cerveau. La cinétique d'apparition de cette forme phosphorylée est particulière. En effet, entre 3,5 et 4 mois d'âge, des inclusions nucléaires de synucléine sont détectable dans le cerveau, entre 6 et 7 mois d'âge, ces inclusions deviennent cytoplasmiques. Cette étude a aussi permis de montrer que ces souris développent aussi une synucléinopathie dans le système nerveux entérique, plus précisément dans les plexus myentériques, détectable entre 3,5 et 4 mois d'âge. Cet article montre l'apparition parallèle et simultanée de la synucléinopathie spontanée dans le SNE et le SNC de cette lignée transgénique. (Bencsik *et al.*, 2014).

Pour les deux lignées observées, l'exposition par l'eau de boisson au paraquat est parfaitement tolérée et aucune perte majeure dans les effectifs de chaque lot n'est observée. Les souris suivent une prise de poids constante, n'indiquant aucunes différences entre les souris exposées et les souris contrôles. Aussi, les tests locomoteurs de Rotarod n'indiquent pas de différences sur les compétences locomotrices entre les souris exposées et les témoins.

L'exposition au paraquat pendant 6 semaines par voie orale chez la souris C57Bl/6 permet d'observer plusieurs éléments. (1) Il n'y a pas de protéines d'α-syn phosphorylée en S129 détectable dans le système nerveux entérique de ces souris aux temps d'exposition considérés, (2) Une augmentation significative de la GFAP remarquée dans ces plexus myentériques. Ceci montre que dans cette lignée, l'exposition orale au paraquat induit une gliose réactionnelle dans les intestins mais n'induit pas de synucléinopathie aux temps d'exposition considérés.

Dans le modèle TgM83, l'exposition par voie orale au paraquat mène à l'induction précoce de la synucléinopathie spontanée dans les intestins de cette souris, visible par l'apparition de l'α-syn phosphorylée S129 dans les plexus myentériques dès 6 semaines d'exposition au paraquat, correspondant à un âge de la souris de 3 mois. Cette expression est constante et persiste à la 7éme et 8éme semaine. Dans les contrôles, les plexus myentériques ne sont pas marqués par l'α-syn phosphorylée S129, comme il est visible dans les résultats de cet article. Cependant, dans des données non publiées nous remarquons l'apparition de l'α-syn phosphorylée S129 dans les contrôles à la 9ème semaine d'exposition,

correspondant à un âge de 17 semaines soit environ 4 mois (résultats non exposés dans cet article). Dans cette lignée murine aussi, une surexpression de la GFAP est également identifiée dès 6 semaines d'exposition au paraquat. Il est à noter que l'analyse en parallèle des cerveaux de ces souris indique l'absence d'α-syn phosphorylée aux temps d'exposition considérés, tant de la SNpc que dans le tronc cérébral.

En résumé ces résultats montrent l'accélération d'une pathologie de l'α-syn dans le système nerveux entérique de souris transgéniques exposées au paraquat. Ceci représente un modèle d'exposition à un pesticide attestant du pouvoir d'accélération d'une synucléinopathie de la substance considérée.

J Neuropathol Exp Neurol
Vol. 0, No. 0, 2017, pp. 1–12
doi: 10.1093/jnen/nlx092

OXFORD

ORIGINAL ARTICLE

Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α-Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α-Synuclein Transgenic Mice

Nicolas Naudet, MSc, Emilie Antier, BS, Damien Gaillard, BS, Eric Morignat, MSc, Latifa Lakhdar, PhD, Thierry Baron, DVM, PhD, HDR, and Anna Bencsik, PhD, HDR

Abstract

The misfolded α-synuclein protein, phosphorylated at serine 129 (pSer129 α-syn), is the hallmark of Parkinson disease (PD). Detected also in the enteric nervous system (ENS), it supports the recent theory that PD could start in the gut, rather than the brain. In a previous study, using a transgenic mouse model of human synucleinopathies expressing the A53T mutant α-synuclein (TgM83), in which a neurodegenerative process associated with α-synuclein occurs spontaneously in the brain, we have shown earlier onset of pSer129 α-syn in the ENS. Here, we used this model to study the impact of paraquat (PQ) a neurotoxic herbicide incriminated in PD in agricultural workers) on the enteric pSer129 α-syn expression in young mice. Orally delivered in the drinking water at 10 mg/kg/day for 6–8 weeks, the impact of PQ was measured in a time-dependent manner on weight, locomotor abilities, pSer129 α-syn, and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression levels in the ENS. Remarkably, pSer129 α-syn was detected in ENS earlier under PQ oral exposure and enteric GFAP expression was also increased. These findings bring additional support to the theory that neurotoxic agents such as PQ initiate idiopathic PD after oral delivery.

Key Words: α-Synuclein, A53T, Chronic oral exposure, Enteric nervous system, Paraquat, Parkinson disease.

INTRODUCTION

Parkinson disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disease in the world after Alzheimer disease. In Europe, PD crude prevalence rate ranges between 65.6 per 100 000 and 12 500 per 100 000 (1). PD belongs to the so called alpha-synuclein (α-syn) aggregation diseases, also named synucleinopathies, including at least 3 diseases: PD, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy (2). These diseases are characterized by a neurodegeneration associated with accumulation of a pathological form of α-syn and propagated in cerebral structures, such as Lewy neurites and bodies, neuronal inclusions for PD or dementia with Lewy bodies, and glial cytoplasmic inclusions for multiple system atrophy (3, 4). Lewy bodies are composed mostly of α-syn and ubiquitin (5–7). Phosphorylation at serine 129 (pSer129 α-syn) and oligomerization of α-syn are recognized as key events in PD pathogenesis (8, 9). The distribution of Lewy inclusions in the brain has been associated with PD staging (10–12). The temporal progression of the disease revealed by these studies suggests that the pathology could initiate other than in the brain, such as the digestive tract and olfactory bulb, possibly as a result of oral or inhalation exposure to xenobiotic agents carrying neurotoxicity. This hypothesis, called Braak's theory, was reinforced by several descriptions of pathological α-syn deposits in various peripheral nervous tissues, particularly in the enteric nervous system (ENS) of advanced as well as of preclinical PD cases (13, 14). Among the suspected xenobiotics, agricultural chemicals were identified by several epidemiological studies (15–17). Tanner et al reported a list of pesticides that present a higher correlation with the appearance of PD (18). Among them, pesticides inhibiting the mitochondrial Complex I and increasing oxidative stress appear to be more prone to induce sporadic PD upon exposure. Amid suspected products, rotenone, maneb and paraquat (PQ) have been studied experimentally and confirmed their neurotoxic effect in accordance with typical PD features (19, 20). PQ has a structure similar to that of MPP^+ (deriving from 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin [MPTP]), a well-known toxic molecule that can cause permanent Parkinsonian syndrome in humans. Also known as 1, 1′-dimethyl-4, 4′-bipyridinium, PQ is a quaternary ammonium nonselective herbicide progressively banned from the market in several countries but is still widely used in many countries all over the world. PQ was shown to be linked with early PD onset and its neurotoxicity has been assessed by several studies (16, 21).

From the Neurodegenerative Disease Unit (NN, TB, AB); PFEA Unit (EA, DG, LL); and Epidemiology Unit (EM), French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses) Laboratory of Lyon, Université de Lyon, Lyon, France

Send correspondence to: Anna Bencsik, PhD, HDR, Neurodegenerative Disease Unit, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses) Laboratory of Lyon, Université de Lyon, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon, France; E-mail: anna.bencsik@anses.fr

This study was partly supported by ANSES; however, there is no grant number associated with this funding source. Nicolas Naudet is supported by a doctoral grant from the Academic Research Community 3—Région Auvergne—Rhône Alpes.

The authors have no duality or conflicts of interest to declare.

Supplementary Data can be found at http://www.jnen.oxfordjournals.org.

© 2017 American Association of Neuropathologists, Inc.

When it comes to linking PD initiation with oral exposure to pesticides there is a paucity of published documentation. One study has shown the link between mice oral exposure to pesticide (i.e. rotenone) with pathological staging of PD, supporting Braak's hypothesis of the peripheral initiation of the disease (22). Very few studies are using oral exposure to study the impact of pesticides on PD and, to the best of our knowledge, there have been no studies investigating the impact of oral exposure to pesticides on the α-syn pathology within the ENS, with the exception of the work published by Pan-Montojo et al (22). However, studies using other routes of administration of pesticides (e.g. intravenous or intraperitoneal routes) represent the majority of the available research. In 2007, Prasad's team showed that PQ can accumulate in the mouse brain after oral administration in a dose-dependent manner. Systemic injection at the dose of 10 mg/kg showed that PQ persists in the ventral midbrain of mice for a prolonged time compared with other organs, with a half-life of ~1 month, indicating that PQ crosses the blood–brain barrier and persists within the brain (23, 24).

With the above considerations, we set up the first study to investigate the potential neurotoxic effects of PQ, administrated orally, on the ENS in mutant TgHuA53T transgenic mice overexpressing human α-syn, with the A53T mutation along with murine α-syn (TgM83 lineage) (25). In this mouse model, the pathological α-syn (pSer129 α-syn) appears spontaneously in the brain and ENS several months before the symptoms appear (26). The pSer129 α-syn is detectable clearly from the age of 6 months in the brain, and as early as 4 months in the ENS (26); therefore, we used young mice (2 months-old) exposed chronically for a period of 2 months. Using immunohistochemical (IHC) techniques, we analyzed the expression of the pSer129 α-syn in ENS of PQ-exposed mice compared with controls.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Design

We used a transgenic mouse model of human synucleinopathy, TgM83 (HuA53T α-syn transgenic mice), that overexpresses A53T mutant human α-syn under a prion promoter (B6; C3H-Tg(SNCA)83Vle/J) (25). Groups of 23 (exposed) and 11 (control) transgenic mice were composed of young (2 months-old, 19–23 g) homozygous TgM83 male and female mice (produced in Anses Lyon approved animal facilities, PFEA). A wild type control group of 12 young, female C57Bl/6 mice (8 weeks-old, #18–22 g body weight) expressing only murine α-syn (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) was used for PQ exposure (n = 6) and control tap water exposure (n = 6). Mice were maintained in the PFEA with a controlled temperature and hygrometry, 12-hour day/night cycle and were fed ad libitum. All the experimental procedures were conducted in compliance with procedures agreed by ANSES/ENVA/UPEC ethic committee (N°14-004).

PQ (methyl viologen dichloride hydrate, ref. 856177, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was administered to TgM83 mice by drinking water (50 μg/mL), ad libitum, for 6, 7, or 8 weeks (n = 7–8/time point; Fig. 1A) and to C57Bl/6 mice by drinking water (50 μg/mL), ad libitum, for 6 weeks (n = 6; Fig. 1B); approximate daily PQ intake is roughly equivalent to 10 mg/kg bw/day taking account an average daily water intake estimated to be ~1.5 mL/10 g body weight/day; http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/mouse.html). Because PQ is stable in water for more than 14 days at 54 °C (http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation04/paraquat.pdf) and sensitive to UV actions, a fresh PQ solution was prepared every 14 days and kept at 4 °C in glass bottle covered with aluminum sheet. The solution was used as drinking water that was changed twice a week. Weights were monitored weekly. After initial training, basal locomotor performances for each mouse were recorded prior to pesticide exposure by performing 2 rotarod tests weekly: endurance (3 × 5 minutes at 20 RPM) and acceleration (2 minutes at 4–40 RPM). The mean latency to fall was recorded and analyzed. At each end-point, mice were killed by 200 μL of pentobarbital (54.7 mg/mL) i.p. injection. Intestines were collected from the distal stomach to the distal colon, opened and rinsed in a bath of 0.1 M PBS, and then rolled in spiral shape directly within an inclusion cassette with the upper section at the center, using a method adapted from Moolenbeek et al (27) (Supplementary Data Fig. S1A). Once postfixed for at least 48 hours in a buffered 10% formalin solution, samples were embedded in paraffin following a routine protocol. Five-micrometer sections of guts were collected on adhesive slides (Surgipath X-tra adhesive, Leica, Wetzlar, Germany).

IHC Detection of pSer129 α-Synuclein and GFAP in ENS

Identification of the pSer129 α-syn (1/500 ab 51253, AbCam, Cambridge, UK) as a marker of α-synucleinopathy, and the detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1/500, ab7260, AbCam, Cambridge, UK) as a marker of a reactive gliosis in the ENS was accomplished by IHC. Importantly, if several antiphosphorylated α-synuclein antibodies successfully detect phosphorylated form in the CNS of mouse ([P-syn/81 A] [ab184674], [EP1536Y], and [ab 51253]), only one allows its detection in the ENS (ab 51253) (Supplementary Data Fig. S2). The IHC procedure applied was similar to that described previously (26). Briefly, successive slides of gut sections were used to reveal each of the markers. Biotinylated secondary antibodies used at 1/200 (antiRabbit ref. 4010-05 and antimouse ref. 1010-05, Cliniscience, Nanterre, France), combined with avidin biotin complex (Vectastain ABC HRP Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) and 3, 3′-diaminobenzidine peroxidase intensified with nickel (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Vector Laboratories), revealed the specific staining that appeared as dark brown deposits (Supplementary Data Fig. S1C–E). Finally, the histological organization of each tissue sample was visualized using aqueous hematoxylin staining.

To characterize the type of enteric neurons that sustain pSer129 α-synuclein expression, a double-labeling experiment was conducted, as described previously (28), using either rabbit polyclonal anti tyrosine hydroxylase (TH) antibodies (1:200, Abcam) or mouse monoclonal anticholine acetyltransfer-

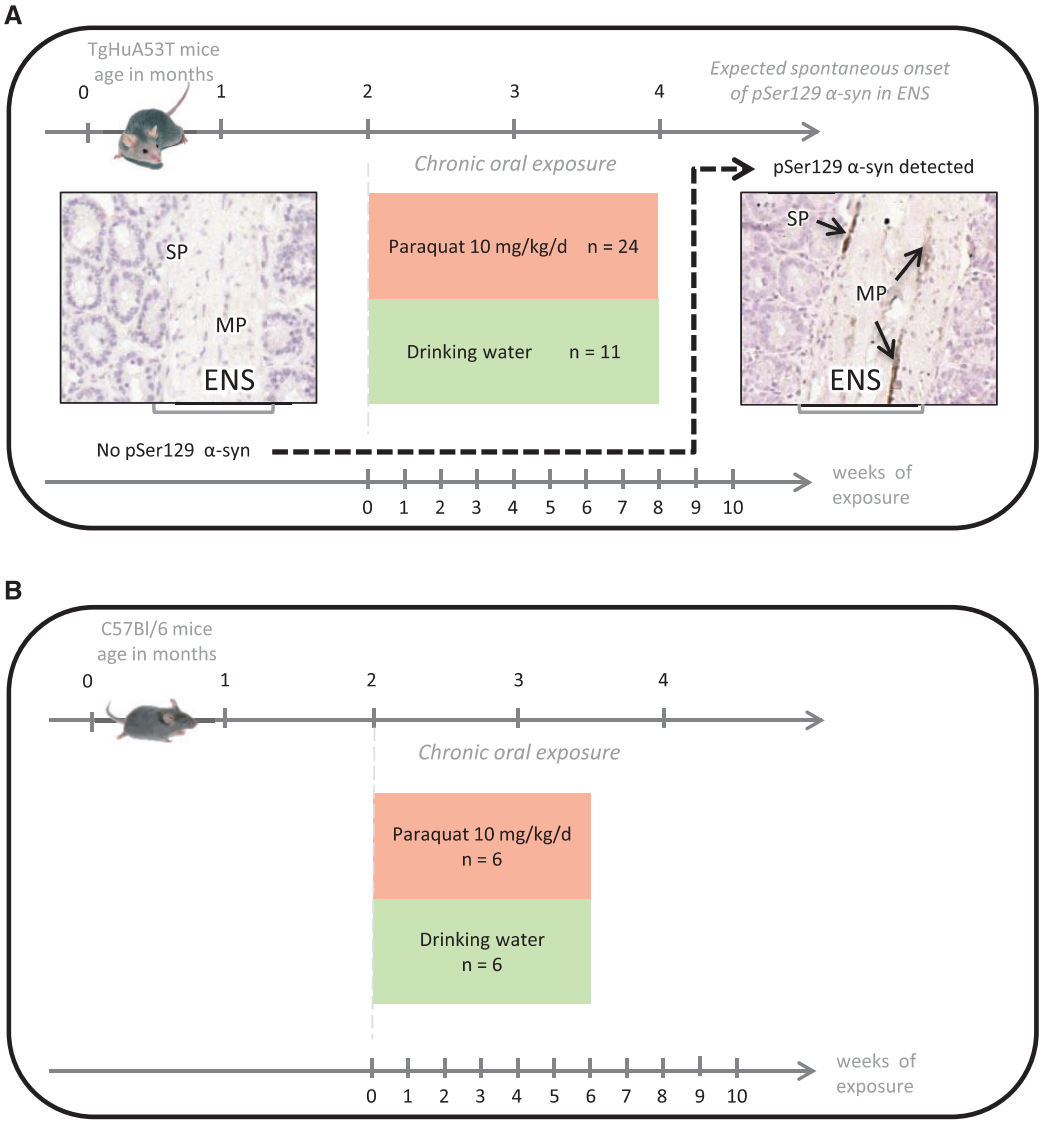


FIGURE 1. (A) Experimental design of the chronic paraquat (PQ) oral exposure experiments in TgM83 in order to study the impact on pSer129 α-synuclein expression in the ENS. PQ was delivered in the drinking water (50 μg/mL, ad libitum) for 6, 7, and 8 weeks (n = 23) compared with control mice (n = 11) exposed to only tap water as drinking water. The endpoints were selected with the knowledge of absence pSer129 α-synuclein expression in the ENS expected in young mice of control groups. This is illustrated in the left panel by a microphotograph of an intestine section, compared with obvious expression in each animal from the age of 4 months. The right panel shows the pSer129 α-synuclein expression detected by IHC in the ENS, which appeared as dark brown deposits in neurons of the muscular plexus). **(B)** Experimental design of the chronic PQ oral exposure experiments in the control wild type group (C57Bl/6). PQ was delivered in the drinking water (50 μg/mL, ad libitum) for 6 weeks (n = 6) compared with control mice (n = 6) exposed to only tap water as drinking water.

ase (ChAT) antibodies (1: 200, Chemicon, Temecula, CA). Gut samples were first labeled with pSer129 α-synuclein antibodies following the same protocol as above. Then, after DAB-$NiCl_2$ staining, the slides were thoroughly rinsed in 0.1 M PBS prior to a 30-minute incubation in a blocking reagent (Roche-Boehringer, Meylan, France) solution at RT. Subsequently, tissue samples were incubated with antiTH or antiChAT antibodies overnight at RT. Again, the avidin–biotin complex system was used to detect antibody binding sites, but peroxidase activity was detected using AEC (3 amino-9 ethyl-carbazol) that produces red precipitates. Finally, the histological organization of each tissue sample was visualized using aqueous hematoxylin staining.

Quantitative Study of pSer129 α-Synuclein and GFAP Expression in ENS

Observations and image captures (10× objective) were performed on an Olympus BX51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) coupled to an image analysis station (Explora

Nova, La Rochelle, France). The sample preparation (Swiss roll method) allowed complete access of the entire gut from the duodenum to the end of the colon using only 1 slide. To cover a representative area of ENS, 10 (GFAP) to 15 (pSer129 α-syn) images were randomly collected in the largest part available, the jejunum (Supplementary Data Fig. S1B). A classical scoring system of phosphorylated α-syn and GFAP markers in each mouse and among the 10–15 images per mouse was refined to a semiquantitative approach. The surrounding background for each image to be analyzed was subtracted systematically and automatically. Densities of phosphorylated α-syn and GFAP in the ENS of the jejunum were assessed using Morpho Strider software (Explora Nova, La Rochelle, France) by measuring the staining inside the region of interest (ROI), the ENS for the gut (Supplementary Data Fig. S1F–I). The density of staining was calculated by the formula:

$$\textit{Density of staining} = \frac{\text{Surface stained by antibody of interest}}{\text{Surface of the ROI}} \times 100$$

Results are expressed as means of density of pSer129 α-syn or GFAP staining within the nervous plexus.

Statistical Analyses

Survival estimates were computed using the Kaplan Meier method and survival distributions were compared between groups using the log rank test. Comparison of the weight between exposed and control mice was done the same way. The Welch *t*-test was used to compare the latency between control and PQ groups every week for acceleration and endurance. Statistical analyses for quantification of density of staining of pSer129 α-syn and GFAP were done comparing exposed to control groups using the one way ANOVA test, after having verified the homoscedasticity with the Levene test. Statistical analyses were made with R software (R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org).

RESULTS

Chronic Oral Exposure to PQ up to 8 Weeks Had No Significant Effect on Mouse Weight, Survival, and Locomotor Performances

PQ oral exposure was from 6 to 8 weeks on 3.5–4-month-old TgM83 mice. At this age, transgenic mice do not yet show PD-like pathology (paralysis) that appears rather from 8 months of age; however, as shown in our previous study, pSer129 α-syn starts to be detectable at the age of 4 months in the ENS and 6 months in the brain (26). Weight and survival of young TgM83 mice indicated no significant differences between PQ-exposed mice and controls (Supplementary Data Fig. S3A, B). The 2 locomotor tests (endurance and acceleration) performed weekly on mice using rotarod apparatus showed no significant impairment of mice locomotor skills along PQ oral exposure (Supplementary Data Fig. S3C, D). In the wild type control group, PQ oral exposure performed during 6 weeks on C57Bl6 mice did not trigger weight or survival differences with the nonexposed group. There was no significant alteration either in the locomotor performances measured by the rotarod tests (data not shown).

Oral Exposure to PQ Does Not Induce pSer129 α-Synuclein Expression in the ENS of C57Bl/6 Mice

The phosphorylated S129 α-syn was not observable in any of the C57BL6 mice exposed to PQ for 6 weeks (Fig. 2A). However, the response of the glial compartment of the ENS investigated through the level of GFAP expression appeared significantly ($p < 0.0001$) increased (Fig. 2B) compared with the controls. This suggests the presence of a reactive gliosis in the ENS compartment of PQ-exposed mice.

Oral Exposure to PQ Leads to Earlier pSer129 α-Synuclein Expression in the ENS of TgM83 Mice

The expression of pSer129 α-syn revealed by IHC was quantified in several portions of the jejunum both visually and numerically. In control groups ($n = 4$) exposed to normal drinking water, pSer129 α-syn appeared to be faintly detectable (~4/15 images faintly stained per positive mouse) in the ENS of some mice (3/11 animals), and within a few neurons of the ENS, mostly in the myenteric plexus. At 8 weeks, the expression of pSer129 α-syn appeared more clearly in 2 out of 4 mice as revealed by the higher density detected using quantitative analysis (Fig. 3A). This could be interpreted as the first signs of local accumulation expected to appear more clearly in older mice (26). Strikingly, in the PQ-treated group, pSer129 α-syn was clearly detectable in 19/23 mice, and as early as from 6 weeks of exposure in 7/8 mice (Fig. 3A, B). Quantitative analyses showed that pSer129 α-syn immunolabeling was significantly higher ($p < 0.001$) in PQ-exposed mice and these differences in the levels of expression appeared similar after 7 and 8 weeks of exposure.

Oral Exposure to PQ Leads to GFAP Expression in the ENS of TgM83 Mice

To complete this observation, the response of the glial compartment of the ENS was studied through the level of GFAP expression. The control group revealed no obvious GFAP staining in the jejunum sections whatever the time point considered. After 6 weeks of exposure, in the PQ-exposed group, GFAP level of expression was significantly ($p < 0.001$) increased compared with control group, and was similarly increased after 7 weeks of exposure; after 8 weeks of PQ exposure, GFAP expression was the highest (2.5× compared with the level reached after 6 weeks of exposure) suggesting a progressive reactive gliosis (Fig. 4A, B).

Phosphorylated α-Synuclein Is Mainly Expressed by ENS Neurons

The GFAP and pSer129 α-synuclein immunostainings on successive gut sections (Fig. 5G, H) clearly showed that neuronal cells rather than glial cells express abnormal α-syn.

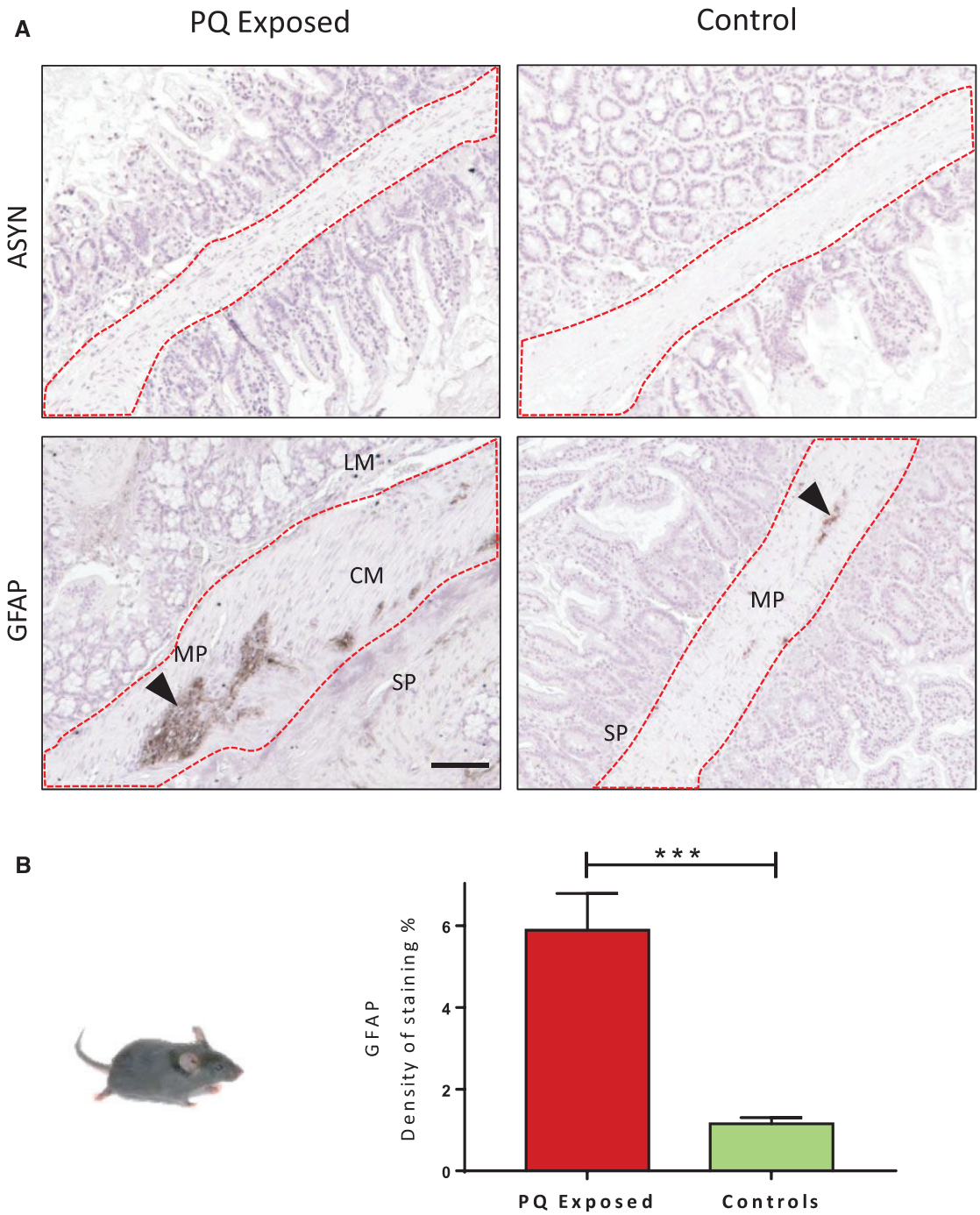


FIGURE 2. pSer129 α-syn IHC analyses in the ENS of wild type control group, C57Bl/6 mice exposed to paraquat (PQ) by drinking water or not (control). **(A)** Absence of pSer129 α-syn in the ENS of wild type mice, whereas a significant increase of GFAP (dark brown staining, arrow) is clearly seen in exposed animals. **(B)** Numeric quantification of GFAP density of staining in PQ-exposed and control mice. Data were analyzed by unpaired *t*-test ****$p < 0.0001$. SP, submucosal plexus; MP, myenteric plexus; CM, circular muscle; LM, longitudinal muscle. Scale bar: 100 μm.

However, a computer-assisted superposition of the labeling obtained on 2 successive slides suggested that some glial cells may accumulate a pathological form of α-syn (Fig. 5 inset G, H). In the PQ-exposed mice, cholinergic and catecholaminergic neurons most likely hosted the pSer129 α-synuclein. Indeed, in terminal stage TgM83 mice, double labeling using a specific antiChAT antibody revealed that cholinergic neurons of the myenteric plexus were accumulating

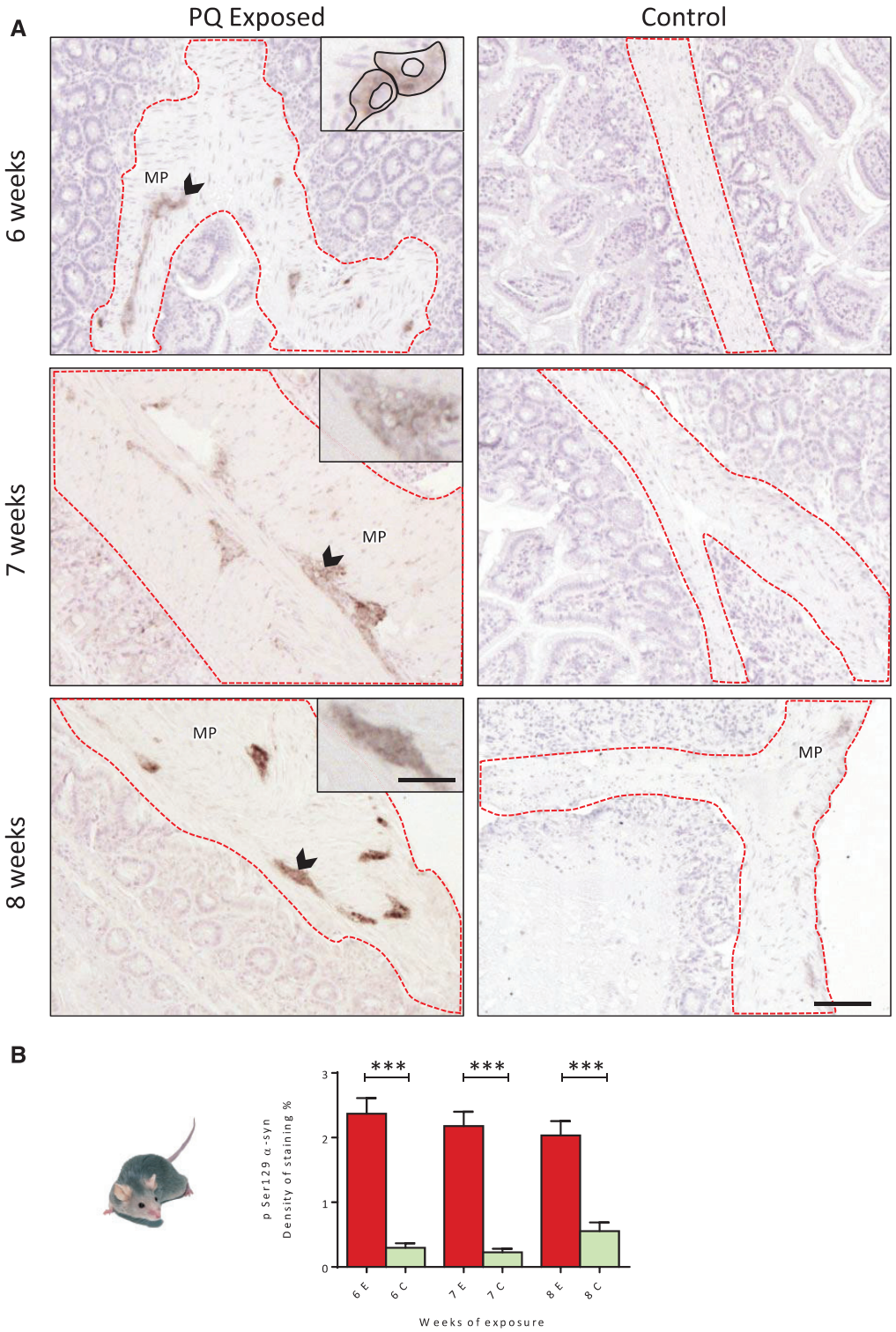


FIGURE 3. (A) Immunohistochemical detection of pSer129 α-syn (dark brown deposits) in the ENS of TgM83 mice exposed to PQ by drinking water up to 8 weeks at 10 mg/kg/day. **(B)** Time-dependent evolution of density of staining of pSer129 α-syn expressed in the ENS. PQ orally delivered was associated with a significant pSer129 α-syn increase as early as 6 weeks after the beginning of exposure. One way ANOVA test was used to analyze this data set; ***$p < 0.001$. E, Exposed; C, Control. Scale bars: Images 100 μm—insets 270 μm.

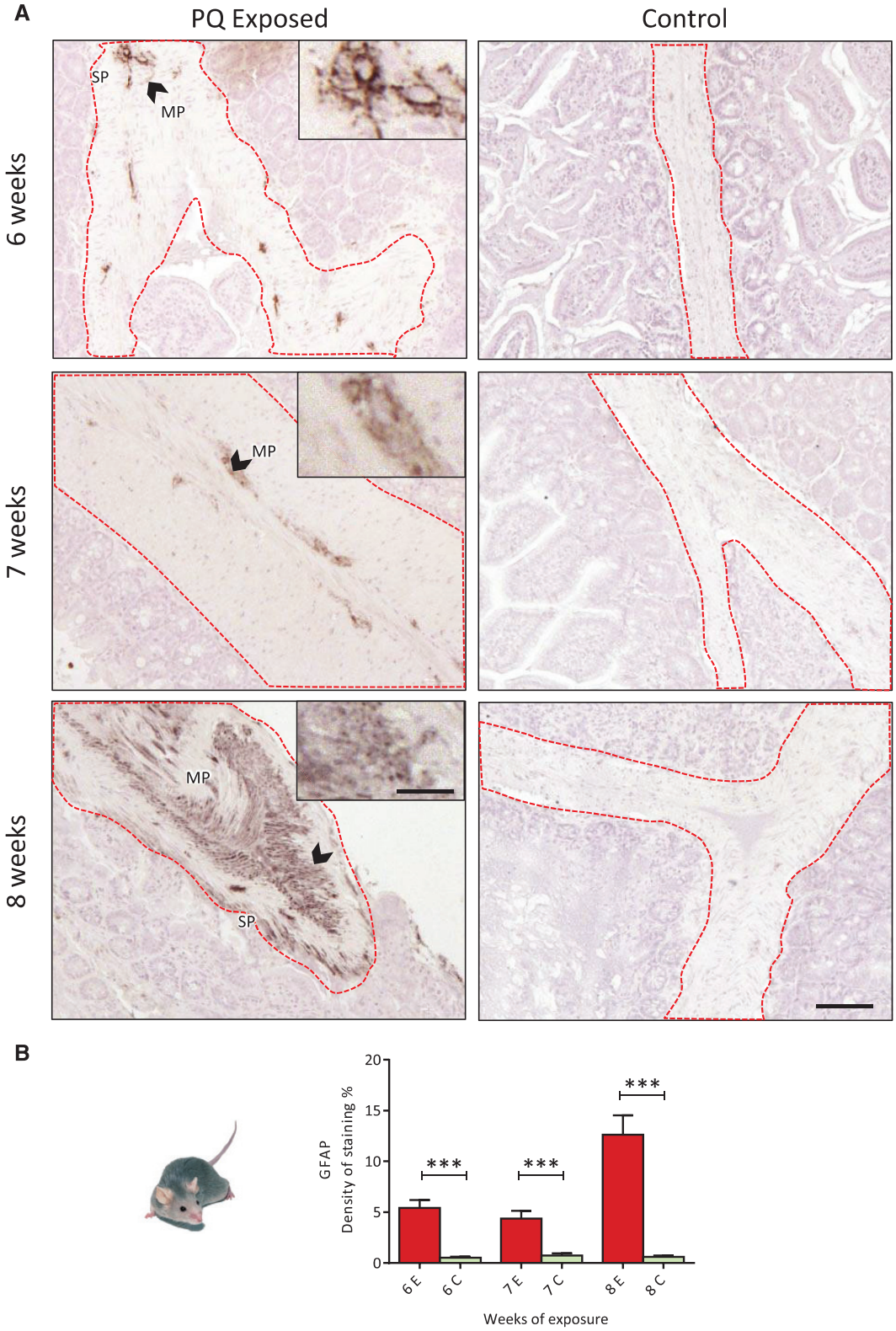


FIGURE 4. (A) Immunohistochemical detection of GFAP (dark brown deposits) in the ENS of TgM83 mice exposed to PQ by drinking water up to 8 weeks at 10 mg/kg/day. **(B)** Time-dependent evolution of density of staining of GFAP expressed in the ENS. PQ orally delivered was associated with a significant increase of GFAP expression in TgM83 mice ENS was observed (up to 5-fold after 8 weeks of exposure). One way ANOVA test was used to analyze this data set; ***$p < 0.001$. E, Exposed; C, Control. Scale bars: Images 100 μm—insets 270 μm.

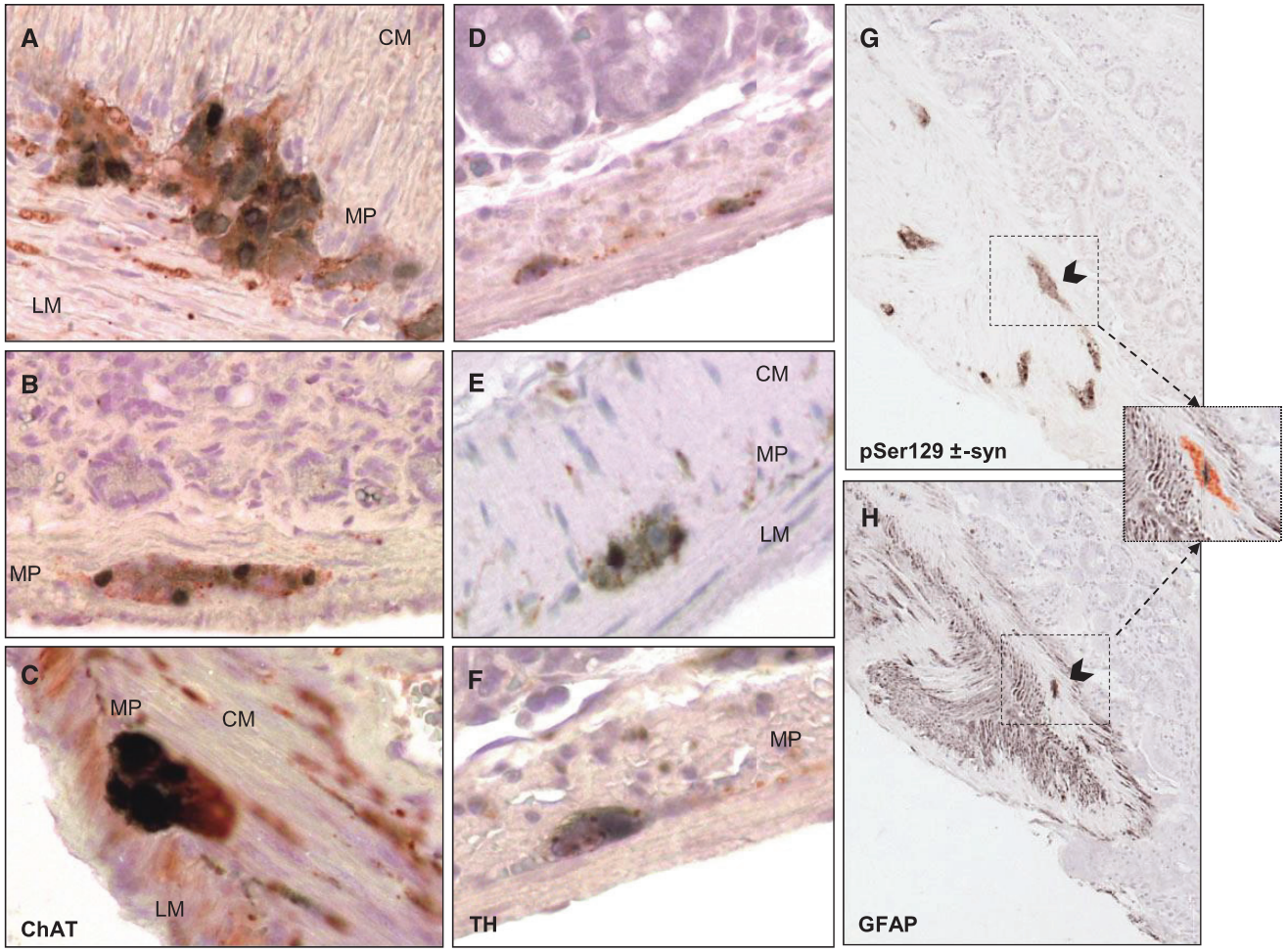


FIGURE 5. Cholinergic and catecholaminergic neurons of the enteric nervous system express phosphorylated α-synuclein. **(A)** Double immunolabeling shows that pSer129 α-synuclein (diffuse staining black-stained areas) colocalized with ChAT-immunoreactive neurons (red-stained areas) in the myenteric plexus. **(B)** Similarly, spheroid-(Lewy-bodies) like inclusions of pSer129 α-synuclein also colocalized with ChAT-immunoreactive neurons. **(C)** At higher magnification, large inclusions of pSer129 α-synuclein are detected within the soma of cholinergic neurons, but less so in their processes. (SP, submucosal plexus; MP, myenteric plexus; CM, circular muscle; LM, longitudinal muscle). **(D–F)** Double labeling shows that pSer129 α-synuclein expression (black-stained areas) in the submucosal plexus can be associated with TH-immunoreactive cells (red-staining) as illustrated in the myenteric plexus **(E, F)**. Phosphorylated α-Syn **(G)** and GFAP **(H)** immunostainings driven on successive gut sections clearly show that neuronal cells rather than glial cells express abnormal α-syn. However, some enteric glial cells may be able to host phosphorylated α-Syn as shown by the computer assisted superposition of these images (inset).

pSer129 α-synuclein within their cell bodies, and apparently less so in their neuronal processes (Fig. 5A–C). Not all aggregates of pSer129 α-synuclein colocalized with ChAT-labeled cell bodies. Although myenteric neurons are not frequently reported to be positively labeled with TH antibody, the possibility that catecholaminergic neurons may also accumulate pSer129 α-synuclein in the ENS was examined. The TH staining was less intense compared with ChAT staining in terms of number of labeled cells; some myenteric as well as submucosal neurons were immunoreactive for TH (Fig. 5D–F), and in the myenteric plexus, double labeling revealed that TH-positive cell bodies hosted pSer129 α-synuclein aggregates (Fig. 5E, F).

Eight-Week Oral Exposure to PQ Does Not Lead to Earlier pSer129 α-Synuclein Expression in the Brain of TgM83 Mice

To investigate the possible impact of PQ on brain expression of phosphorylated α-Syn, the brainstem and other brain regions were carefully analyzed. Compared with a positive control brain, no induction of phosphorylated α-Syn was seen, either in the dorsal nucleus of vagus nerve or elsewhere in the brain (Fig. 6), whatever the conditions studied, suggesting no effect of PQ administration on central expression of pathological α-Syn after 6 weeks of consecutive exposure through drinking water.

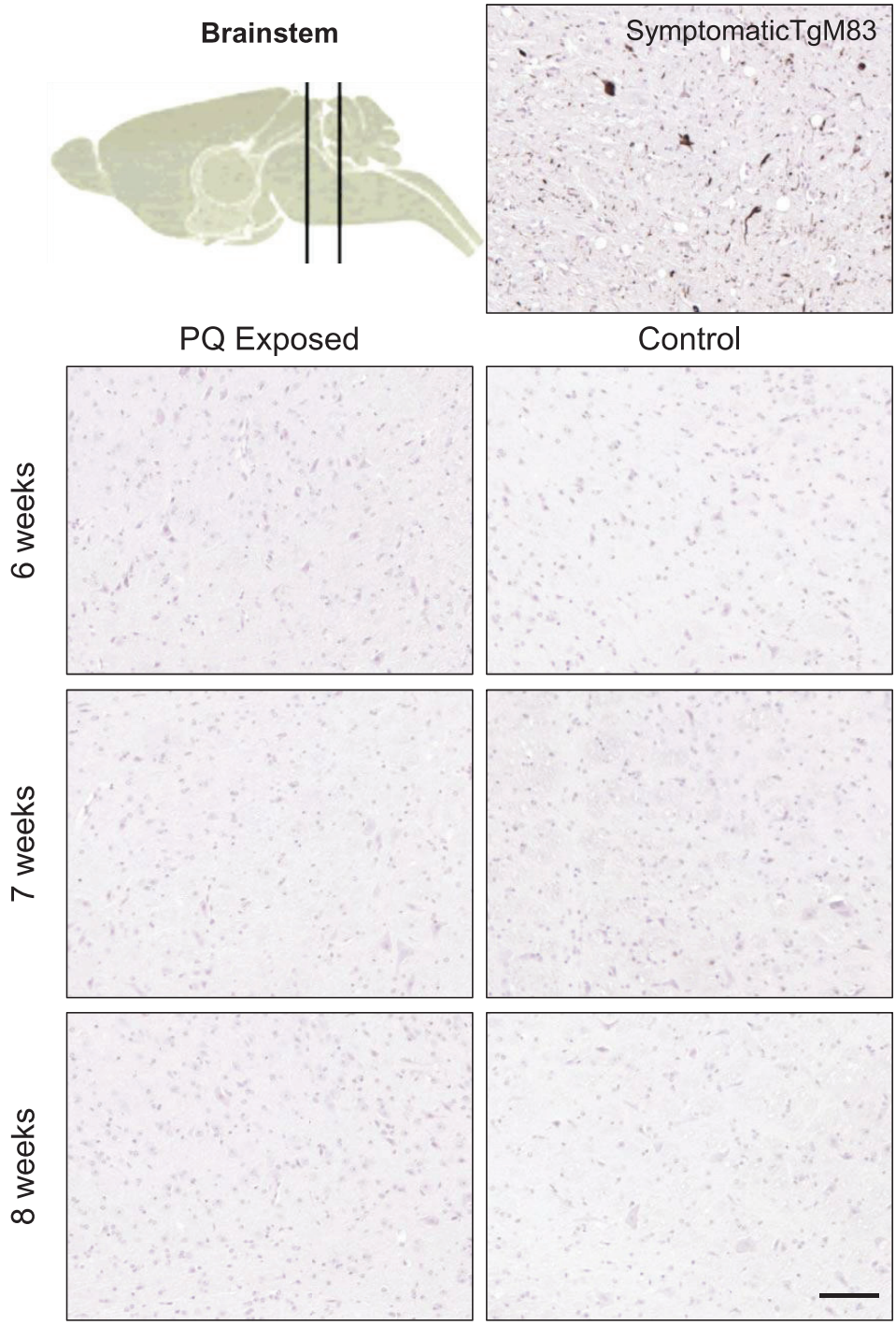


FIGURE 6. Absence of pSer129 α-syn in the brainstem of TgHuA53T mice after 6–8 weeks of oral exposure to PQ. A brain of 1.5-year-old TgHuA53T mouse was used as positive control. At the final stage of the disease, many neurons were accumulating pSer129 α-syn in the brainstem. Scale bar: 25 μm.

DISCUSSION

PQ dichloride, a widely used herbicide all over the world, is one of the pesticides that has been recognized as a possible factor in the pathogenesis of PD (18). Still, its neurotoxicity, far from being completely understood, has been mainly studied experimentally in central nervous system cells and not in peripheral nervous system cells, despite the possibility of interaction of PQ with the peripheral nervous system, notably in the case of oral exposure. The present original in vivo experiment using chronic PQ exposure by oral route

was designed in order to explore the latest hypothesis on early onset of PD in peripheral nervous compartments (29–31). PQ can reproduce some of the features of PD in animals, specifically a loss of dopaminergic neurons and an increase of α-syn aggregation in the brain (32, 33). Also, PQ is known to induce PD-like symptomatology in mice (34) but nothing has been reported on the effects of PQ in the ENS. In addition, the oral route is the less investigated, and as already underlined by Prasad et al in earlier studies, the manner of exposure appears to be critical (23). For the oral route, intragastric administration of PQ at 10 mg/kg/day in wild type mice was reported to be efficient but also triggered some deaths among mice (23, 35). In our experiment, we used the same daily dose, but PQ was delivered chronically using drinking water in order to mimic in a more realistic way what could happen if someone is orally exposed to that kind of environmental xenobiotic. Thus, the present study explored in a relevant way the question of how PQ administrated through drinking water may trigger early adverse effects on the ENS.

Our results show that up to 6 weeks of chronic exposure at 10 mg/kg/day through drinking water, PQ is well tolerated by the C57Bl6 mice, as indicated by absence of loss of weight and of mortality. Rotarod tests show no motor deficiencies suggesting no impact of dietary exposure to PQ on the brain. In the ENS present in the digestive tract, we report the absence of phosphorylated α-syn expression in the wild type mice exposed to PQ after 6 weeks; however, this observation cannot be considered as a proof of absence of neurotoxicity of PQ on the ENS of wild type mice since PQ exposure leads to reactive gliosis, displayed by the significant overexpression of GFAP. Still the duration of exposure appears not long enough to induce any pSer129 α-syn expression. This first observation in wild type mice could not be related to previous studies as there is no other study focusing on the effect of PQ in the ENS. In contrast, the results are different in the transgenic mice: at 8 weeks of chronic exposure at 10 mg/kg/day through drinking water, PQ is well tolerated by the transgenic mice, as indicated by absence of loss of weight and of mortality. Rotarod tests show no motor deficiencies, suggesting there is no effect of dietary exposure to PQ on the brain. In the meantime, the IHC analyses of the intestines revealed remarkable effects on pSer129 α-syn and GFAP expression. Indeed, pSer129 α-syn appeared to be detectable faintly in the ENS of control group and in few animals only. This shows the beginning of the spontaneous accumulation of the phosphorylated protein, observed in this model more clearly from 4 months of age (26). In contrast, in the PQ-exposed group, pSer129 α-syn was clearly detected in >80% of the mice, with strong expression levels, revealing a major impact seen after only 6 weeks of exposure and signifying an acceleration of the pathological process associated to this mouse model. Most probably cholinergic neurons harbor these pSer129 α-syn aggregates in accordance to the double labeling observed in the ENS of transgenic mice showing advanced disease. However, the Lewy bodies or inclusion bodies observed in old symptomatic TgM83 mice were not observed in the younger animals exposed to PQ. It does not mean that Lewy bodies could not be induced by PQ exposure at higher dose or longer time of exposure.

In contrast to these observations in the ENS, the brains of these mice were all devoid of any phosphorylated α-Syn. This indicates that the neurotoxic effect of PQ is expressed earlier in the ENS compared with the CNS and suggests that the dose of PQ and/or duration of the study were not sufficient to trigger an induction of pSer129 α-syn in the CNS compartment too. The difference between ENS and CNS could be explained by the fact that enteric neurons are more directly exposed to the ingested PQ. The intensity of the staining observed at this first experimental time point available suggests that expression of pSer129 α-syn may have possibly started even before. This first observation in TgM83 mice could not be related to previous studies as, to the best of our knowledge, there is no other study focusing on the effect of PQ in the ENS. An article published by Pan-Montojo et al studied the effect of rotenone orally administered to C57Bl/6 mice for 8 or 16 weeks in the ENS (22). Among other results, they showed that rotenone oral exposure by IG route leads to release and accumulation of pSer129 α-syn in the ENS. Therefore, using a different pesticides related to PD, our study adds experimental arguments in favor of PD initiation within this compartment and demonstrates a reason to focus on the ENS along with other toxin exposure. Altogether, our data suggest that the transgenic model could be more sensitive to PQ compared with wild type mice, but at this dose and quite short duration of exposure it is not sufficient to trigger pathological α-syn expression in the brain.

To complete this observation, we also introduced the study of the enteric glial cells. The contrast between control and exposed guts was even more obvious for the glial marker GFAP. The overexpression of GFAP, revealing a reactive gliosis when the phosphorylated α-syn is detectable, suggests a possible cooperation between enteric glial cells and neurons accumulating pathological α-syn. However, the likelihood that some glial cells may directly accumulate a pathological form of α-syn cannot be excluded, as suggested in some cases. This possibility is known and described in the brain, notably in specific forms of human alpha-synucleinopathies, such as multiple system atrophy, characterized by glial cytoplasmic inclusions. Reactive gliosis has been reported in the intestines of patients with inflammatory bowel disease (36, 37). Further data collected in cultured enteric glial cells support the link between enteric glial cells and inflammation; notably, these in vitro experiments report that pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis alpha increase the expression levels of GFAP (38) and that once reactive, enteric glia can secrete interleukin-6 (39). However, because there is not as much knowledge on the involvement of glial cells in the ENS compared with CNS, it is difficult to better interpret the link between the overexpression of GFAP and pathological α-syn expression observed in our model. An enteric glial reaction was suggested to occur in PD patients as shown by an upregulation of GFAP mRNA in colon biopsies (40) and was confirmed by increased GFAP protein levels in both mucosal and submucosal enteric glial cells (41). Indeed, even within the brain, the complexity of the role of astroglial cells in the initiation and progression of PD is far from being understood (42). This could, however, indicate that, to a greater extent, the inflammatory pathway may be activated with the pathological α-syn

presence, supporting the hypothesis that inflammation is involved in α-syn misfolding process. Interestingly, a recent study reported that inflammation may be even more severe in A53T mutant context (43); further studies will be necessary, starting with a more precise following of the kinetic response of both markers pSer129 α-syn and GFAP in the ENS under a xenobiotic stressor. Additionally, a deeper characterization of the pathological form of α-syn, using markers of other forms of α-syn, should be done, and in these longer studies, appearance of inclusion bodies should be combined with analysis of other markers such as ubiquitin and p62.

It is also known that PQ is weakly metabolized by the brain compared with other organs, as shown by local PQ accumulation in different brain areas (23). Therefore, it would be important to assess whether any PQ accumulation would also be possible in the ENS. Indeed, this could probably play an important role in the local response to such a chronic xenobiotic exposure. Thus, an immediate goal of the next study might be the precise quantification of PQ in the ENS compared with the brain. This would allow for exploration of the link between local PQ quantity and pathological α-synuclein accumulation and also to precisely determine the daily doses that could be associated with a deleterious effect on α-synuclein expression in the ENS. In the meantime, our study suggests that new studies need to be performed after longer exposures, resulting in higher cumulated doses to identify possible effects on pSer129 α-synuclein appearance within the brain, studies that should help to better delineate the hypothetical role of the ENS in the initiation of PD after chronic xenobiotic exposure.

Conclusions

Our study demonstrates that orally delivered, PQ is able to induce a neurotoxic response in the ENS of A53T mutant human α-synuclein transgenic mice, as shown by earlier and clear expression of pathological α-syn in this compartment combined to reactive gliosis induction, signifying an acceleration of the pathological process associated to this mouse model. This could be explained by the fact that enteric neurons are more directly exposed to the environmental xenobiotics ingested. Our study parallels Braak's theory in highlighting the ENS as a possible initiation site for α-synucleinopathy-related pathologies such as PD.

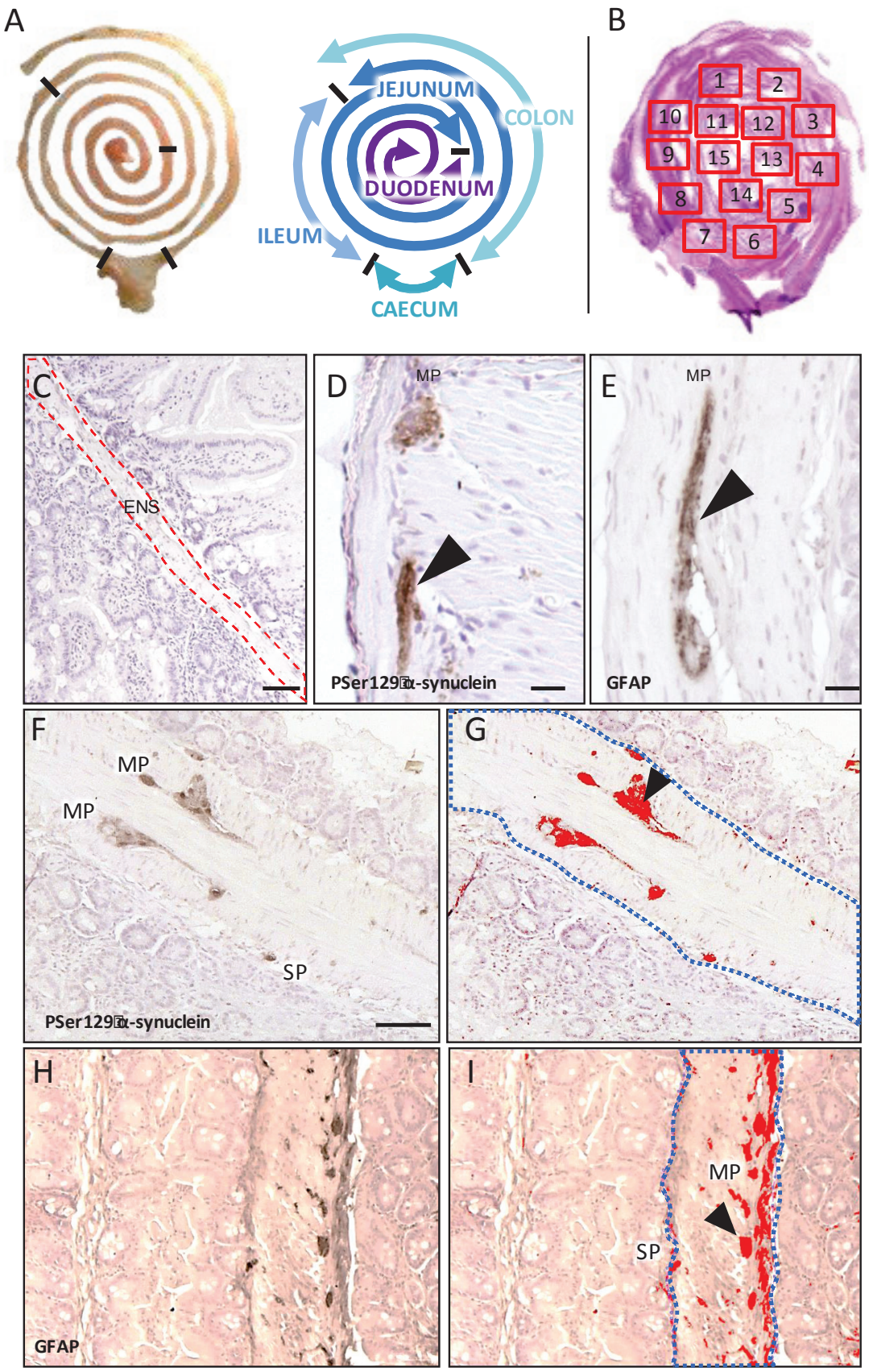
Finally, we show that the TgM83 transgenic mouse line may be a sensitive model addressing environmental stressors such as PQ, and is relevant for the study of how oral ingestion of such neurotoxic agents may initiate the accumulation of phosphorylated α-synuclein, the hallmark of PD, in the ENS. By showing an acceleration/exacerbation of the pathology within the ENS, where α-syn is the molecular target, this model should be a valuable tool for studying early events triggered by the other pesticides suspected to be linked to PD.

REFERENCES

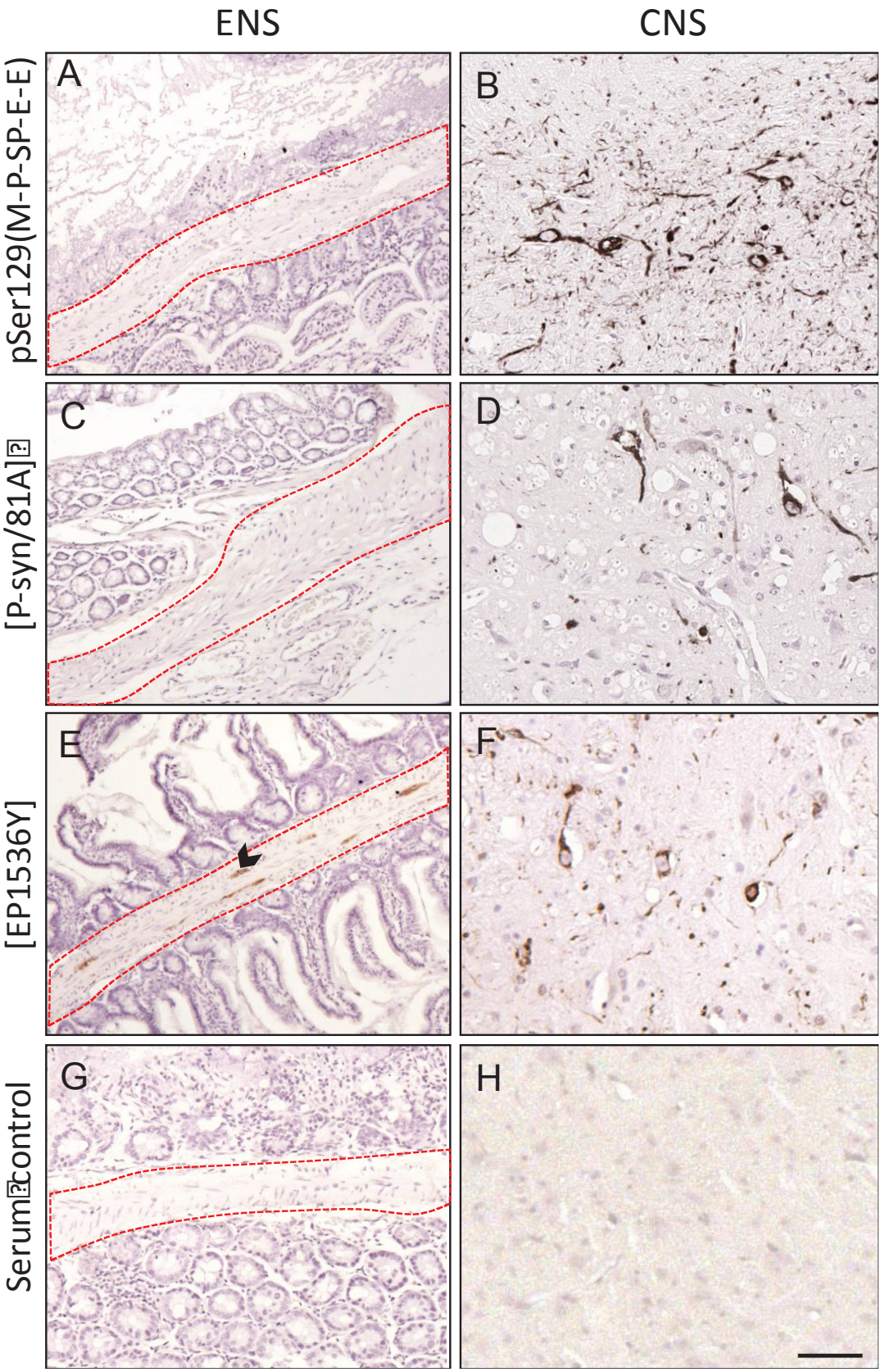
1. von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, et al. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. Eur Neuropsychopharmacol 2005;15:473–90
2. Goedert M, Spillantini MG. Lewy body diseases and multiple system atrophy as alpha-synucleinopathies. Mol Psychiatry 1998;3:462–5
3. Li JY, Englund E, Holton JL, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. Nat Med 2008;14:501–3
4. Xia Q, Liao L, Cheng D, et al. Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies. Front Biosci 2008;13:3850–6
5. Gomez-Tortosa E, Newell K, Irizarry MC, et al. alpha-Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. Acta Neuropathol 2000;99: 352–7
6. Shults CW. Lewy bodies. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:1661–8
7. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, et al. Alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:6469–73
8. Walker DG, Lue LF, Adler CH, et al. Changes in properties of serine 129 phosphorylated alpha-synuclein with progression of Lewy-type histopathology in human brains. Exp Neurol 2013;240:190–204
9. Zhou J, Broe M, Huang Y, et al. Changes in the solubility and phosphorylation of alpha-synuclein over the course of Parkinson's disease. Acta Neuropathol 2011;121:695–704
10. Braak H, Del Tredici K. Potential pathways of abnormal tau and alpha-synuclein dissemination in sporadic Alzheimer's and Parkinson's diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol 2016;8:a023630
11. Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, et al. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). J Neurol 2002;249(Suppl 3):III/1–5
12. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. Neuropathol Appl Neurobiol 2007;33:599–614
13. Ruffmann C, Parkkinen L. Gut feelings about alpha-synuclein in gastrointestinal biopsies: biomarker in the making? Mov Disord 2016;31: 193–202
14. Hilton D, Stephens M, Kirk L, et al. Accumulation of alpha-synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. Acta Neuropathol 2014;127:235–41
15. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. Lancet Neurol 2016;15:1257–72
16. Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lourdes Bastos M, et al. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases–a mechanistic approach. Toxicol Lett 2014;230: 85–103
17. van der Mark M, Brouwer M, Kromhout H, et al. Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results. Environ Health Perspect 2012;120:340–7
18. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. Environ Health Perspect 2011;119:866–72
19. Giraldez-Perez R, Antolin-Vallespin M, Munoz M, et al. Models of alpha-synuclein aggregation in Parkinson's disease. Acta Neuropathol Commun 2014;2:176
20. Murakami S, Miyazaki I, Miyoshi K, et al. Long-term systemic exposure to rotenone induces central and peripheral pathology of Parkinson's disease in mice. Neurochem Res 2015;40:1165–78
21. Moretto A, Colosio C. The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson's disease: epidemiological studies and experimental data. Toxicology 2013;307:24–34
22. Pan-Montojo F, Schwarz M, Winkler C, et al. Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. Sci Rep 2012;2:898
23. Prasad K, Tarasewicz E, Mathew J, et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat accumulation in mouse brain. Exp Neurol 2009;215: 358–67
24. Prasad K, Winnik B, Thiruchelvam MJ, et al. Prolonged toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat in mouse brain. Environ Health Perspect 2007;115:1448–53
25. Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, et al. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. Neuron 2002;34:521–33.
26. Bencsik A, Muselli L, Leboidre M, et al. Early and persistent expression of phosphorylated alpha-synuclein in the enteric nervous system of A53T mutant human alpha-synuclein transgenic mice. J Neuropathol Exp Neurol 2014;73:1144–51
27. Moolenbeek C, Ruitenberg EJ. The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine. Lab Anim 1981;15:57–9

28. Bencsik A, Lezmi S, Baron T. Autonomic nervous system innervation of lymphoid territories in spleen: a possible involvement of noradrenergic neurons for prion neuroinvasion in natural scrapie. J Neurovirol 2001;7: 447–53
29. Braak H, de Vos RA, Bohl J, et al. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. Neurosci Lett 2006;396: 67–72
30. Braak H, Del Tredici K, Rub U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging 2003;24:197–211
31. Del Tredici K, Braak H. Review: sporadic Parkinson's disease: development and distribution of alpha-synuclein pathology. Neuropathol Appl Neurobiol 2016;42:33–50
32. Fahim MA, Shehab S, Nemmar A, et al. Daily subacute paraquat exposure decreases muscle function and substantia nigra dopamine level. Physiol Res 2013;62:313–21
33. Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, et al. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. J Biol Chem 2002;277:1641–4
34. Bove J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. Neuroscience 2012;211:51–76
35. Mitra S, Chakrabarti N, Bhattacharyya A. Differential regional expression patterns of alpha-synuclein, TNF-alpha, and IL-1beta; and variable status of dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after Paraquat treatment. J Neuroinflamm 2011;8:163
36. Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, et al. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:13306–11
37. von Boyen GB, Schulte N, Pfluger C, et al. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. BMC Gastroenterol 2011;11:3
38. von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, et al. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. Gut 2004;53:222–8
39. Ruhl A, Franzke S, Collins SM, et al. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;280:G1163–71
40. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease. Neurobiol Dis 2013;50:42–8
41. Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, et al. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. J Neurochem 2014;130:805–15
42. Bruck D, Wenning GK, Stefanova N, et al. Glia and alpha-synuclein in neurodegeneration: a complex interaction. Neurobiol Dis 2016;85:262–74
43. Hoenen C, Gustin A, Birck C, et al. Alpha-synuclein proteins promote pro-inflammatory cascades in microglia: stronger effects of the A53T mutant. PLoS One 2016;11:e0162717

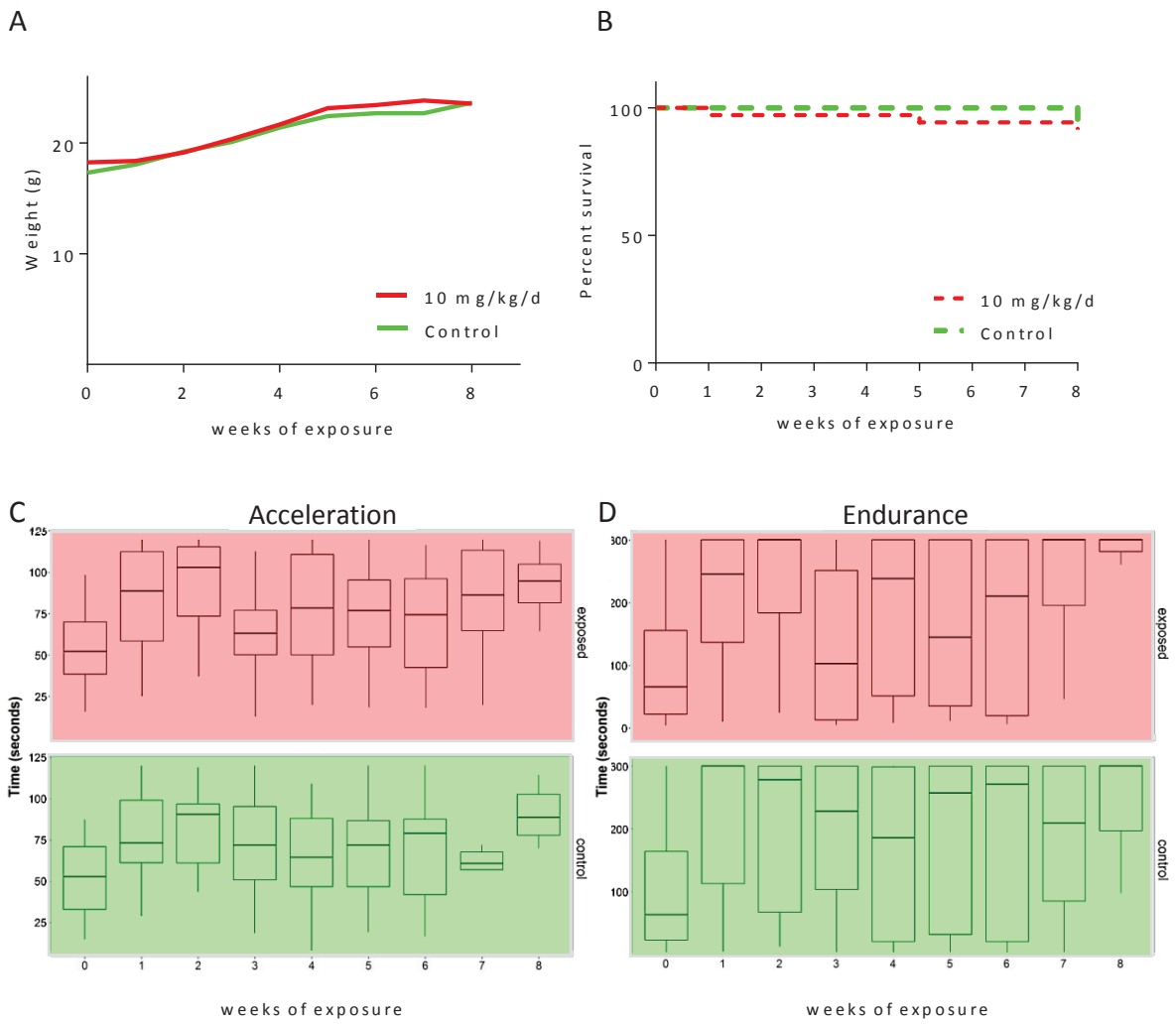
Supplemental Data Figure 1



Supplemental Data Figure 2



Supplemental Data Figure 3



3 Article N°2 : A widespread increase of a-synuclein expression in the brain and intestine of mice chronically exposed to paraquat through drinking water

Nicolas Naudet, Eric Morignat, Jérémy Verchère, Latifa Lakhdar, Dominique Bétemps, Anna Bencsik, Thierry Baron

Résumé des résultats soumis à publication dans le journal Neurotoxicology

Naudet et al., 2017 – soumis le 05 septembre 2017

Après avoir montré l'accélération d'une synucléinopathie lors de l'exposition par voie orale au paraquat par des techniques histologiques dans un premier article publié, les expérimentations suivantes ont porté sur l'étude biochimique de l'α-syn. Les résultats de cette étude sont soumis à publication dans le journal Neurotoxicology.

L'un des premiers obstacles concernant l'étude biochimique des niveaux d'α-syn dans l'intestin a été la mise en place d'une technique d'homogénéisation des échantillons intestinaux. Après plusieurs essais de dissections fines et d'homogénéisation d'intestins de souris à l'aide d'un ribolyseur, un protocole permettant d'obtenir un échantillon fluide et homogène a été définit. Ainsi, les intestins sont nettoyés, séparés en 7 portions comprenant le duodénum, le jéjunum (3 portions), l'iléon, le caecum et le colon, puis broyés à l'aide d'un ribolyseur en appliquant 3 cycles consécutifs de 50 secondes à 6000 tours minutes. Ceci permet d'obtenir une consistance fluide, facilement pipettable.

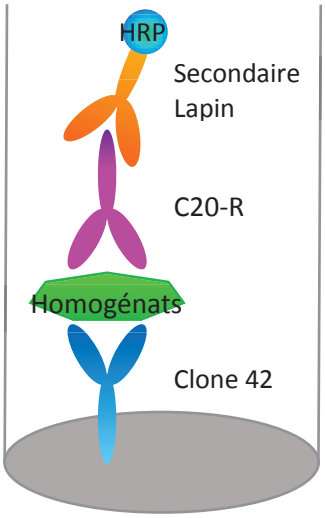


Figure 38 : Représentation schématique du format de test ELISA adapté de Emmanouillidou et al. 2011. Capture de la protéine d'intérêt avec l'anticorps Clone 42 et détection de celle-ci avec l'anticorps C20-R. Détection de ce complexe avec anticorps un secondaire dirigé contre les anticorps lapins, couplé à la peroxydase de Raifort (HRP).

Un format de tests ELISA détectant simultanément les formes d'α-syn non-phosphorylées et phosphorylées a été utilisé dans nos expérimentations (Emmanouilidou *et al.*, 2011). Ce format de test ELISA est décrit comme pouvant être utilisé pour la détection de l'α-syn avec une sensibilité et une spécificité élevée. Dans ce format, la capture l'α-syn se fait avec l'anticorps Clone 42 (BD bioscience). Cet anticorps reconnaît un épitope conservé dans l'α-syn humaine et de rongeur, il est dirigé contre la séquence 91-99 de la protéine et reconnait donc les formes humaines et murines de l'α-syn, mais ne reconnait ni la β-syn, ni la γ-syn. La détection de l'α-syn capturée se fait avec l'anticorps polyclonal C20R (Santa Cruz), dirigé contre un épitope inconnu situé dans la partie C-terminale de la protéine, lui aussi reconnaissant les formes humaines et murines. Ainsi sur la base des anticorps sélectionnés, ce format peut détecter les formes physiologiques et phosphorylées de la protéine, formes de l'α-syn décrites comme « totales » dans la suite de ce document. Il est à noter que ce format ne permet pas de discriminer une souris pathologique d'une souris saine, étant donné son affinité pour toutes les formes d'α-syn cellulaires non tronquées sur leur domaine C-terminal. Aussi, dans des travaux préliminaires à cet article, nous avons noté que, dans les concentrations utilisées pour étudier les échantillons cérébraux et intestinaux de la lignée TgM83 (à savoir 1/5000ème pour le cerveau et 1/2000ème pour l'intestin), le test ELISA présenté ici ne détecte que la forme humaine surexprimée dans cette souris. En effet, aux mêmes concentrations, des échantillons provenant de la lignée C57Bl/6 ne présente

aucune détection de la protéine, cette lignée étant le fond génétique associé à la lignée TgM83.

Le premier objectif de cet article a été d'étudier la distribution physiologique de l'α-syn dans le SNC et dans le SNE des deux lignées murines présentées. Nos portions d'intérêt sont, dans le cerveau, les bulbes olfactifs, le cortex, le striatum, l'hippocampe, le mésencéphale, le cervelet et le tronc cérébral et dans l'intestin, les zones d'intérêt sont le duodénum, les trois portions du jéjunum, l'iléon, le caecum et le colon.

Pour la lignée C57Bl/6, la distribution physiologique de l'α-syn dans le cerveau suit un gradient rostrocaudal, les bulbes olfactifs, le cortex et le striatum ayant une expression relativement égale, l'hippocampe ayant l'expression la plus forte. Les structures à l'arrière du cerveau, à savoir le mésencéphale, le cervelet et le tronc cérébral ayant une expression environ 20 fois plus faibles que les structures rostrales. Les intestins de ces souris présentent aussi une distribution de l'α-syn sous un gradient rostrocaudal. Le duodénum ayant une faible concentration en α-syn, le duodenum relativement plus, l'iléon encore plus forte et le caecum et le colon ayant les plus fortes concentrations en α-syn totale. Pour la lignée TgM83, les niveaux d'α-syn cérébrales présentent une expression relativement homogène, avec une expression plus forte dans l'hippocampe et le cervelet. Dans l'intestin, il est aussi vu un gradient rostrocaudal, mais à une concentration bien plus élevées que dans la lignée C57Bl/6.

Le second objectif de cet article est d'étudier les modulations des niveaux de cette α-syn « totale », en condition de stress xénobiotique induit par un pesticide, lors de l'exposition par voie orale au paraquat. Des souris jeune de 8 semaines d'âge ont ainsi été exposées au paraquat par l'eau de boisson pendant 9 semaines. Les cerveaux et intestins de ces souris ont été récoltés ont été analysés par ELISA, avec le même format utilisé pour étudié la distribution physiologique de l'α-syn, et par western blots, pour prouver la spécificité de chaque anticorps.

D'une façon marquante, l'exposition au paraquat induit une augmentation générale des niveaux de l'α-syn totale dans les deux compartiments nerveux étudiés et pour les deux lignées murines choisies ici. Pour la lignée C57Bl/6, toutes les zones du cerveau

sélectionnées présentent une augmentation significative de l'α-syn. Ces analyses par tests ELISA montrent que l'exposition chronique au paraquat dans l'eau de boisson pendant 9 semaines augmente les taux d'α-syn dans toutes les régions du cerveau examinées chez les souris transgéniques (Figure 2A de l'article n°2) et M83 transgéniques (Figure 3A de l'article n°2). Malgré des concentrations beaucoup plus faibles dans le mésencéphale, le tronc cérébral et le cervelet dans la lignée C57Bl/6, les taux d'α-syn mesurés en utilisant des dilutions d'homogénats cérébraux plus faibles (à savoir 1/50ème) montrent également une augmentation dans ces régions cérébrales pour les souris exposées. Les niveaux d'α-syn montrent également une augmentation au niveau du caecum et du côlon pour les souris sauvage (Figure 2B de l'article n°2) et transgéniques (Figure 3B de l'article n°2). Dans les trois sections de proximales de l'intestin, situées dans l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), les taux d'α-syn ne montrent pas de différences significatives entre les souris exposées et non exposées, ce qui pourrait être lié au très faible niveau d'expression de la protéine dans ces zones pour les deux lignées de souris. Ces résultats ont été analysés en utilisant le test statistique de Mann-Whitney comparant chaque section exposée à la section appariée du groupe non exposé.

Des analyses par western blots ont été menées en parallèles pour prouver la spécificité de notre anticorps de capture et de notre anticorps de détection. Ces tests ont été concluants et montrent la spécificité de chaque anticorps.

Pour aller plus loin dans notre analyse, nous avons transféré ces résultats à un statisticien afin qu'il modélise l'effet du paraquat sur les systèmes nerveux central et entérique par une analyse multifactorielle. Ce type d'analyse permet d'étudier un ensemble d'individus décrits par un ensemble de variables afin de représenter les données par deux graphiques : la représentation dans un plan cartésien sur l'axe séparant le mieux les groupes d'individus et la représentation par cercle de corrélation où les données pointant dans la même direction sont corrélées. Cette analyse permet de consolider l'interprétation des données obtenues par ELISA car elle montre une séparation nette entre les groupes exposés et les témoins. Une analyse de « *clustering* » ans *a priori*, regroupant les individus par « *clusters* » montre que pour les souris C57Bl/6 l'exposition au paraquat par voie orale a un effet clair sur les souris, seule une souris (1/8) exposée se retrouve dans le cluster des souris

témoins. Pour les souris TgM83, deux souris (2/7) exposées se retrouvent dans le cluster des témoins. Ces résultats confirment que le paraquat induit une augmentation généralisée des niveaux d'α-syn tant dans le système nerveux central que dans l'intestin, plus précisément dans le caecum et le colon.

Notre étude donne de nouveaux éléments sur les effets de l'exposition orale et à faible dose au paraquat sur les niveaux α-syn. De surcroît, nous fournissons ici la base d'un modèle expérimental utile et facile à mettre en œuvre pour d'autres études sur les effets des pesticides en relation avec la protéine d'α-syn.

HIGHLIGHTS

- a-Syn is more abundant in the frontal brain regions of C57Bl/6 mice
- In the intestine, much higher levels of a-Syn are found in the large intestine
- Paraquat exposure induces a widespread increase of a-Syn levels in the brain
- Paraquat exposure increases a-Syn levels in the large intestine

*Manuscript
Click here to view linked References

A widespread increase of alpha-synuclein expression in the brain and intestine of mice chronically exposed to paraquat through drinking water

Nicolas Naudet[1], Éric Morignat[2], Jérémy Verchère[1], Latifa Lakhdar[3], Dominique Bétemps[1], Anna Bencsik[1], Thierry Baron[1]

1 Neurodegenerative Disease Unit, 2 Epidemiology Unit, 3 Animal experimentation Unit, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses) Laboratory of Lyon, University of Lyon, France

Phone: +33 (0) 4 78 69 68 33

Fax: +33(0) 4 78 61 91 45

Address: 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 07

*Corresponding author: Thierry Baron thierry.baron@anses.fr

Keywords: alpha synuclein, brain, intestine, Parkinson's disease, Lewy bodies dementia, pesticide

This manuscript has not been submitted elsewhere. All the authors agreed on this version of the manuscript and have contributed to it.

None of the authors have a commercial or other association that might pose a conflict of interest.

This work was supported by ANSES. Nicolas Naudet is supported by a doctoral grant from Région Auvergne-Rhône-Alpes.

ABSTRACT

Alpha-synuclein (a-Syn) is an abundant neuronal protein involved in some neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD) but the mechanisms of pathogenesis still remain to be elucidated. It has been shown that even a relatively modest increase of a-Syn levels is sufficient to trigger pathogenic processes of PD, as shown by familial cases of PD caused by duplication or triplication of the SNCA encoding gene. Other genetic abnormalities such as mutations on SNCA gene (A30P, E46K, A53T…) can increase susceptibility and trigger early PD. Here we exposed orally wild-type (C57Bl/6) or transgenic mice (M83) expressing A53T mutated human a-Syn to paraquat (10 mg/kg/day), a well-known herbicide linked to PD risk, to decipher the early molecular events in two nervous compartments. By a-Syn quantitation in the brain and intestine using an ELISA test, our study shows that a 9 weeks exposure to paraquat through drinking water increases a-Syn levels in the whole brain and in the large intestine, in both mouse lines. To go further in the analysis of our results, we set up a multifactorial statistical analysis that also showed a heterogeneous individual response to the pesticide. Our study shows that a chronic oral exposure to low doses of paraquat induces a widespread a-Syn increase, in both central and enteric nervous systems, possibly contributing to explain the increased PD risk reported for this pesticide.

INTRODUCTION

Alpha-synuclein (a-Syn) is a neuronal protein highly expressed at synaptic terminals involved in synaptic activities (Burre *et al.*, 2017). Its involvement in Parkinson's disease (PD) has first been discovered following the identification of cases associated with mutations in the coding sequence of the SNCA gene, leading to amino acid substitutions on the protein such as the A30P, E46K or A53T mutations (Kasten and Klein, 2013; Polymeropoulos *et al.*, 1997). Other rare genetic cases were associated with duplications or triplications of the SNCA gene, leading to constitutive overexpression of the protein in the host; triplication leads to an earlier onset of the clinical disease than duplication, clearly showing the relationship between the a-Syn expression level and PD risk (Chartier-Harlin *et al.*, 2004; Singleton *et al.*, 2003). Some other neurodegenerative diseases are associated to a-Syn accumulation, as in PD. Indeed, intracellular neuronal a-Syn inclusions (called Lewy bodies and Lewy neurites) are also seen in dementia with Lewy bodies (DLB), and glial cytoplasmic inclusions (GCI) in oligodendrocytes are seen in multiple system atrophy (MSA). Most cases of these diseases are considered as sporadic, while hereditary mutations leading to familial cases account for less than 10 percent of total cases of a-synucleinopathies (Klein and Westenberger, 2012).

The etiology of sporadic cases of synucleinopathies remains unknown but seemingly involves a combination of genetic factors and environmental factors. Most data regarding this question have been obtained in PD, certainly in relation with the relatively easy diagnosis of the disease based on its typical motor clinical signs (shaking, rigidity, slowness of movement, and difficulty with walking). This allowed a number of epidemiologic studies that consistently recognized exposure to pesticides as a possible risk factor of the disease (Ascherio and Schwarzschild, 2016; Elbaz *et al.*, 2016; Goldman, 2014). However few studies were able to identify precisely the pesticides that are specifically involved, such as paraquat and

rotenone, which have been related to PD risk in several epidemiological studies (Allen and Levy, 2013; Baltazar *et al.*, 2014; Goldman, 2014).

This led to a large number of experimental studies to decipher the molecular mechanisms that could induce specific neurodegeneration of the nigrostriatal system in wild-type or transgenic mice or in rats following exposure to a neurotoxic compound. Indeed most studies focused on the nigrostriatal system because dopaminergic neurons of the *substantia nigra* are especially vulnerable and heavily affected in PD when typical clinical motor signs occur. However it is now recognized that the disease is much more widespread and can be clinically associated with a number of other clinical signs, more or less specific, sometimes long ago before the recognition of the disease (Klingelhoefer and Reichmann, 2015; Visanji and Marras, 2015). This is notably the case of olfactory deficits and constipation, which have been related to the presence of Lewy bodies and Lewy neurites into the olfactory tract and in the enteric nervous system respectively (Aldecoa *et al.*, 2015; Saito *et al.*, 2016). The Braak's theory postulates that the disease, resulting from a-Syn aggregation spreading, could progress to and throughout the central nervous system from these early lesions, reminding the behavior of prions (Braak *et al.*, 2004; Hawkes *et al.*, 2007; Visanji *et al.*, 2013). Among experimental studies, a series of observations have been recently reported using chronic exposure to rotenone of wild-type C57Bl/6 mice by oral route at low dose. These studies showed that, although rotenone remained undetectable into the brain, nigrostriatal neurodegeneration and motor deficits could be observed after several months of exposure (Pan-Montojo *et al.*, 2010). The a-Syn aggregation observed in the nigrostriatal system was preceded by up-regulation and aggregation of a-Syn into the enteric nervous system from which it could propagate, notably *via* the vagal nerve.

Instead, in our study using oral exposure to paraquat through drinking water, we used the ability of paraquat to easily accumulate into the brain of mice after low doses long-term exposure (Prasad *et al.*, 2009). This could illustrate one of the ways through which the general population may be orally exposed to neurotoxic chemicals, as this can happen for multiple contaminants through the diet (Traore *et al.*, 2016). Our objective here was to examine to what extent the oral exposure to paraquat could modify the a-Syn levels, which we measured using an ELISA test throughout the brain and intestine of mice exposed orally to paraquat. We assessed these effects in C57Bl/6 wild-type mice and in a transgenic mouse model overexpressing a (A53T) mutated form of the a-Syn human protein. We showed that, in both models, 9 weeks of chronic paraquat exposure leads to a widespread increase of a-Syn in both brain and intestine.

METHODS

Animal care

C57Bl/6J mice were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and M83 transgenic mice were produced in Anses Lyon animal facilities. M83 mice (B6;C3H-Tg[SNCA]83Vle/J, RRID:MGI:3603036, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) express the human A53T mutated a-Syn protein under the control of the prion promoter (Giasson *et al.*, 2002). C57Bl/6S mice (Envigo, Huntingdon, UK), presenting a chromosomal deletion of a-Syn gene (Specht and Schoepfer, 2001), were used as control to ensure specificity of our western blots and ELISAs. Mean weight of each mouse was about 20 g. Mice were housed in a room with controlled temperature, hygrometry and light (12h/12h light-dark cycle). Food and water were provided *ad libitum*. All experiments were conducted in Anses Lyon approved experimental facilities (No. C69 387 0801) following the EEC Directive 86/609/EEC

and French decree No. 2013-118 and in compliance with a specific experimental protocol agreed by ANSES/ENVA/UPEC ethic committee (referral N°16-059).

Paraquat administration

Mice (C57Bl/6 male, M83 male and female) were randomly distributed into exposed and control groups (n=5 to 7 per group). Paraquat dichloride (Methyl viologen dichloride hydrate #856177-1G, Sigma Aldrich, Saint Louis MI) was administered to mice through drinking water exposure by dissolving the pesticide directly into opaque water bottles, to protect the solution from light. As paraquat is stable in water at least 1 week, solutions were changed once a week (Prasad *et al.*, 2009). Doses of paraquat were calculated given the theoretical daily water intake of mice (1.5 mL/10 g body weight/day, http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/mouse.html). Based on an average estimated water consumption of 4 mL/day per mouse, paraquat was added to the water at a final concentration of 50 µg/mL, this corresponds to a daily dose of paraquat of ~ 10 mg/kg/day per mouse. Paraquat exposure by drinking water does not provoke taste aversion as normal intake is observed. Mice were continuously exposed to paraquat, beginning at 8 weeks of age and for 9 consecutive weeks. They were then euthanized by intra-peritoneal injection of 200 µL pentobarbital (54,7mg/mL). Brains and intestines were collected. Intestines were opened and rinsed in a 0,1 M PBS to remove the feces, then were rolled with the top of the digestive tract (duodenum) at the center of the spiral. All tissues were stored at -80°C.

Protein extraction

Brains were dissected, separating the olfactory bulbs, cerebral cortex, hippocampus, striatum, cerebellum, mesencephalon and brainstem as reported previously (Betemps *et al.*, 2015). Intestines were cleaned again by scrapping carefully the remaining feces and separated in 7 sections: duodenum, jejunum (3 parts), ileum, caecum and colon. Each part

was carefully weighted and grinded in a grinding tube (Brains: #077533, Dutscher, Brumath, France, Intestines: #3551197, Biorad, Marnes-la-Coquette, France) by a 2x20 seconds at 5000 rpm for brains and 3x50 seconds at 5000 rpm for intestines using a ribolyser (Precellys 24 homogenizer, Bertin Instruments, France). High salt buffer (50 mM Tris–HCl, pH 7.5, 750 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% phosphatase and protease inhibitor cocktails) was then added to a concentration of 10% mass/volume. All these steps involving biological samples were performed in tubes maintained on ice and using ice cold material.

ELISA

A-Syn levels in each sample were measured using a sandwich ELISA. 96 well plates (MaxiSorp™ Nunc, Thermo Scientific) were coated with 0.125 ng/µl of clone 42 monoclonal antibody (BD Biosciences, ref 610787) in 50 mM Na2CO3/NaHCO3 (pH9.6) with 100 µl per well overnight at 4°C. Plates were washed 5 times with 300 µl of phosphate-buffered saline supplemented with 0.05% Tween20 (PBST) using an automatic washer (Hydrospeed, Tecan Life Science, Switzerland). Unspecific binding sites were saturated by adding Superblock T20 PBS blocking buffer (Pierce), shaking for 1 h at 150 rpm at room temperature (RT). Plates were washed again with PBST and tissue homogenates were added to the well (M83 – brain: 1:5000 – intestines: 1:500; C57Bl/6 – brain: 1/500 – intestine: 1:10, unless indicated) and incubated for 2 h with 150 rpm shaking at RT. Exposed and unexposed samples of each brain or intestine portions were analyzed on the same microplates to ensure reliability. Plates were washed again and captured a-Syn was detected by C20-R antibody (Santa Cruz, La Jola, CA) at 1:10000 dilution in PBST + BSA 1% (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, MA) for 1 h at 150 rpm at RT. Plates were washed and HRP tagged anti-rabbit antibody (Anti-HRP rabbit Clinisciences ref 4010-05, France) was applied to the wells at 1:2000 dilution in PBST + BSA 1% for 1 h at 150 rpm at RT. Plates were washed and 100 µL of 3,3',5,5'-

tetramethylbenzidine (TMB) reagent (ref T0440, Sigma Aldrich) was added to each well and incubated for 15 min with shaking at 150 rpm. Enzymatic reaction was stopped by adding 100 µL of HCl 1M. Optical densities (ODs) are read at 450 nm by a microplate reader (CLARIOstar, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). OD values of blank wells, performed in parallel but without adding homogenates, were subtracted from OD values for each well.

Western Blot

Due to different a-Syn levels on each compartments, various volumes of tissues homogenates were used to performed western blots. For M83 mice, equivalent of 40 µg of each brain parts and equivalent of 200 µg of intestinal tissues were runned on gels. For C57Bl/6 mice, equivalent of 200 µg of brain region and 3mg of intestinal tissues were used for each part studied.

Proteins were separated after heat denaturation (5 min at 100°C) on 12% TGX Stain Free FastCast acrylamide gels (ref. 1610185, Biorad), then blotted onto PVDF membranes (0.45µm Immobilon-P, Millipore). After migration, gels were activated for 1 min on Chemidoc MP apparatus (BioRad) and imaging was done using ImageLab software (BioRad). A-Syn was cross-linked to membranes using 0.4% paraformaldehyde diluted in PBS for 30 minutes and unspecific binding sites were saturated by adding 5% milk for 1 h. A-Syn was detected by either clone 42 (1:2000) monoclonal or C20-R (1:10000) polyclonal antibodies, diluted in PBST overnight at +4°C, gently shaking at 15 RPM. Membranes were then incubated with stabilized goat anti rabbit HRP (Interchim #32460) or anti mouse HRP (#32430) (1:1000), incubated for 1 h at room temperature. HRP was then visualized with chemiluminescent substrate (Supersignal WestDura, ref 34076, Thermo).

Statistical analysis

ODs of all the samples measured by ELISA were analyzed by Mann-Whitney test, comparing the means of three repetitions.

Multiple factor analysis (MFA)

A Multiple Factor Analysis was achieved to summarize information resulting from two sets of data, one set being composed by ELISA measures of a-Syn levels in the seven regions of the brain and the other set composed by ELISA measures of a-Syn levels in the caecum and colon, as too low levels of a-Syn are detected into the small intestine. The principle of this method is to reduce multidimensional data to their principal components, based on the assumption that the studied variables are not independent of each other (Bécue-Bertaut and Pagès, 2008). Each mouse is represented in a space with factorial axes defined by the best linear combination of the active variables, i.e. observed variables. Factorial axes are constructed from active variables whereas the interpretation of results is aided by supplementary variables. The two groups of active variables were the 7 brain measures of a-Syn and the 2 intestine measures of a-Syn in caecum and colon. One supplementary variable was used: the status of each mouse (control or exposed). MFA was performed with the "FactoMineR" R package (R Development Core Team, 2010).

Hierarchical ascendant clustering (HAC)

Clustering of mice was investigated using the Euclidian distance between principle coordinates (Bécue-Bertaut and Pagès, 2008). Principal coordinates were determined in a subspace that ensured good quality representation of the data to limit noise, i.e. the number of factorial axes ensuring 95% of the total variance was considered. HAC was performed on the MFA principal coordinates. The generalized Ward's criterion was used as the aggregation criterion for HAC. It consists in aggregating two clusters in a way that minimizes intra-cluster

variance and maximizes inter-cluster variance. HAC was consolidated by a K-means performed on the centers of the HAC clusters. HAC and K-means were performed respectively with R packages “cluster” and “stats”.

RESULTS

Alpha-synuclein (a-Syn) distribution in the brain and intestine of wild-type and M83 transgenic mice

A-Syn levels were measured by ELISA in the different regions of the brain and intestine, using clone 42 monoclonal antibody to capture total a-Syn and C-20R polyclonal antibody as detection antibody (Figure 2 A-B and 3 A-B). These antibodies are recognizing the 91-96 epitope and C-terminal part of the protein respectively. In the experimental conditions used, only the human a-Syn, which is expressed under the control of the prion promoter, is detected in M83 transgenic mice, as the endogenous levels of murine a-Syn are too low to be detected (data not shown). The a-Syn levels measured in both unexposed and paraquat exposed mice showed large individual variations for each brain and intestine regions examined. The general picture of a-Syn distribution throughout the brain and intestine is also illustrated by western blotting using C-20R or clone 42 detection in Figure 1. We checked that loads of proteins were equivalent among the diverse samples in the different Western blot lanes using stain-free gels (Supplemental figure 1). The specificity of a-Syn recognition in both ELISA and Western blot was confirmed by examination of brain and intestine samples derived from C57Bl/6 mice which do not express murine a-Syn (Specht and Schoepfer, 2001).

In the brain of wild type C57Bl/6, a-Syn is more abundant in the frontal regions including the olfactory bulbs, cerebral cortex, hippocampus and striatum, compared to the

mesencephalon, cerebellum and brainstem. In M83 mice, the a-Syn levels in all brain regions are roughly comparable. In the intestine, a-Syn is much more abundant in the caecum and colon in both mouse models (Figure 1, 2B and 3B), and a-Syn levels are lower in the small intestine, even in M83 transgenic mice.

Oral exposure to paraquat increases a-Syn levels in the brain and in the intestine of both wild-type and transgenic mice

ELISA analyses showed that chronic exposure to paraquat through drinking water during 9 weeks increased a-Syn levels in all the brain regions examined, in both wild-type (Figure 2A) and M83 transgenic (Figure 3A) mice. Despite much lower levels into the mesencephalon, brain stem and cerebellum of C5Bl/6 mice, a-Syn levels, measured at lower dilutions of the brain homogenates (1/50), were also increased in these brain regions of exposed mice (supplemental Figure 2). A-Syn levels also showed an increase in the caecum and colon of both wild-type (Figure 2B) and M83 transgenic (Figure 3B) mice. In the three sections of the small intestine (duodenum, jejunum and ileum), differences between exposed and unexposed mice were not statistically significant, which could be related to the very low a-Syn expression in these sections in both mouse lines. Statistical analysis using Mann-Whitney test comparing each exposed and unexposed section are detailed on supplemental data 3.

To go further in the interpretation of our experiments, we performed a multiple factor analysis (MFA), an approach that may underline correlations and clustering in some groups of individuals described by a set of variables (quantitative and / or qualitative). Figure 2C shows correlation circles in C57Bl/6 mice illustrating the consistent response to paraquat exposure. A-Syn levels in all the different regions of the brain are positively correlated with the first dimension and contribute to the construction of this axis. Measures in the caecum and colon are also correlated. The first and second factorial axes bear 67 and 16.4 % of the

information respectively. For M83 transgenic mice, the correlation circle resulting from MFA, shown in Figure 3C, overall gives the same result than in C57Bl/6 mice, but measures from the different regions of the brain appear more correlated. Measures in the intestine are also highly correlated. The first factorial axis bears 63% of the information and the second factorial axis 22% of the information.

Factorial maps, where each point represents a synthesis of the ELISA measures of a-Syn in each sites for each individual mouse, are shown in Figure 2D and 3D for C57Bl/6 and M83 transgenic mice respectively. In C57Bl/6 mice, all unexposed mice have negative abscises in the first factorial axis, whereas all but one exposed mice have positive abscises. The hierarchical clustering achieved on the coordinates of the mice in the first five factorial spaces thus creates one cluster composed of all the 5 unexposed mice and one exposed mouse, whereas the other cluster contains the 7 remaining exposed mice. M83 transgenic mice are also clearly separated along the first dimension but this clustering also shows 2 of the 7 exposed mice are in the cluster containing the 7 unexposed mice. In both mouse lines, exposed mice appear more disseminated than unexposed mice, which might represent heterogeneous individual response to paraquat exposure.

Overall, our analyses show that, despite some individual variations, a 9 weeks continuous exposure to paraquat through drinking water increases the levels of a-Syn, in both wild-type and M83 transgenic mice, throughout the brain, as well as in the caecum and colon.

DISCUSSION

We set up an experimental study on the effects of chronic oral exposure to paraquat in wild type and transgenic mice. Paraquat is one of the pesticides that have been the most extensively studied in relation with the possible role of pesticides as PD risk factors. This was

historically associated with the identification of the molecular similarities between paraquat and MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), a chemical that had been associated with acute Parkinsonism following accidental injections through the use of contaminated recreational drugs. The paraquat effects have essentially been studied experimentally after intra-peritoneal or sub-cutaneous injections in mice or in rats, often combined with exposure to maneb, a fungicide, suggested to increase the risk of developing PD when associated to paraquat. As shown by the past studies of Prasad et al., paraquat readily accumulates into the brain after chronic exposure of mice by oral route, even *via* the drinking water route (Prasad *et al.*, 2009).

This allowed the study of the effects of paraquat exposure on a-Syn protein levels, which is a critical criterion since an increase of a-Syn levels represents a well-established risk of PD, as shown by genetic PD cases with duplications or triplications of the SNCA a-Syn encoding gene. Even a modest life-long increase of a-Syn expression may represent an increased PD risk, as recently shown from genome-wide association studies (Soldner *et al.*, 2016). Our data revealed that paraquat exposure induced a widespread increase of a-Syn levels in all the brain regions examined and in the intestine after 9 weeks of oral exposure through drinking water, in both C57Bl/6 wild-type mice and M83 transgenic mice overexpressing A53T mutated human a-Syn. Such an effect was already reported in some experimental studies after intra-peritoneal challenge of wild-type mice and rats, but these studies generally focused on the *substantia nigra* or midbrain (Cristovao *et al.*, 2012; Manning-Bog *et al.*, 2002) or on the striatum (Wills *et al.*, 2012) and this effect could be transitory after paraquat injections (Manning-Bog *et al.*, 2002). A more widespread a-Syn increase was reported in high-salt fractions of the brain stem and cerebellum, but not of the cerebral cortex and hippocampus, in the M83 transgenic mouse model used in our study, but only

after combined intra-peritoneal repeated injections of old mice to both paraquat and maneb (Norris *et al.*, 2007). This last result was shown by Western blot detection with the LB509 antibody that specifically recognizes human a-Syn. In our ELISA conditions, using the C20-R polyclonal antibody for a-Syn detection, only the human a-Syn is detected during examination of M83 tissues. Thus, this indicates that both human A53T a-Syn in M83 mice and murine a-Syn in C57Bl/6 are similarly up-regulated after paraquat oral exposure.

Our ELISA data were limited to measures of the total a-Syn levels, without considering possible translational modifications of the protein. In fact we could not detect any serine 129 phosphorylation of the protein (data not shown), as this can be identified in M83 mice with the characteristic clinical disease that develops during aging in this model (Betemps *et al.*, 2014; Betemps *et al.*, 2015). This is however not unexpected since mice were only 4 months old at the end of the protocol, while clinical symptoms occur spontaneously in older mice (≥ 8 months) during normal aging (Giasson *et al.*, 2002). Further studies will be required to examine other possible a-Syn changes such as intra-cellular aggregation (Manning-Bog *et al.*, 2003), protease resistance (Fernagut *et al.*, 2007) or nitration (Norris *et al.*, 2007), that have already been described in similar studies of paraquat toxicity, but only after intra-peritoneal injections and using immunohistochemistry.

Although the ELISA approach considered here may not allow detailed studies at the tissular and cellular levels compared to immunohistochemistry, it easily allows precise quantifications of changes in a-Syn levels. Prior to the identification of widespread a-Syn up-regulation following oral exposure to paraquat, it first showed, in unexposed mice, that differences in the a-Syn levels between the different brain regions were less important for the human a-Syn in the M83 transgenic mice than for murine a-Syn in C57Bl/6 mice. In these wild-type mice, murine a-Syn was much less abundant in the caudal parts of the brain

(mesencephalon, brain stem and cerebellum). Comparative analysis of the different sections of the intestine by both ELISA and Western blot also showed much higher a-Syn levels in the caecum and colon than in the small intestine, in both mouse lines. Overall the a-Syn levels were however much lower in the intestine than in the brain.

To complete our statistical analysis, we performed an MFA to further represent the overall effect of paraquat, considering the information on the a-Syn level in the different sites as a whole. A hierarchical clustering of the mice was also performed on the coordinates of the MFA without using the status information (exposed *vs* unexposed). It discriminated rather well the two populations of exposed *versus* unexposed mice, even if 1 out of 8 exposed C57Bl/6 mouse and 2 out of 7 exposed M83 mice appeared within the clusters of unexposed mice. The reason of these three misclassifications may be related to the large individual variations of measured a-Syn levels and possibly to some variations of exposure through drinking water. It could also be related to genuine variations in individual response of animals to the pesticide exposure. Such variable responses have already been observed for example when neuronal death was assessed in mice orally exposed to rotenone at moderate doses (10 mg/kg/day) during 28 days whereas this was no longer seen at higher doses (30 mg/kg/day). This clear separation of the two populations illustrates the effect of paraquat on the a-Syn level in all sites.

From a methodological point of view, MFA analysis illustrated here from this first set of data could be used to further include additional variables that could be measured from the same series of samples. As far as the molecular pathogenesis of synucleinopathies is concerned, it is indeed known that regional variations in processes such as autophagy (Malkus and Ischiropoulos, 2012), oxidative stress and neuroinflammation (Cristovao *et al.*, 2012; Mitra *et*

al., 2011; Norris *et al.*, 2007; Tsika *et al.*, 2010) can play crucial roles in a-Syn aggregation and neurodegeneration.

Besides, the PD-related toxicity of rotenone has been experimentally examined after oral exposure, in wild-type (Arnhold *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2016; Inden *et al.*, 2007; Pan-Montojo *et al.*, 2010; Pan-Montojo *et al.*, 2012; Perez-Pardo *et al.*, 2017; Tasselli *et al.*, 2013) or transgenic mice (George *et al.*, 2010). Most of these studies included examination of the contribution of the enteric nervous system (Arnhold *et al.*, 2016; Pan-Montojo *et al.*, 2010; Pan-Montojo *et al.*, 2012; Perez-Pardo *et al.*, 2017; Tasselli *et al.*, 2013), in relation with the Braak's hypothesis regarding the PD pathogenesis in humans. This is in contrast with studies about paraquat, for which, to the best of our knowledge, the enteric nervous system has never been studied. Although a-Syn is much less abundant in the intestine, we similarly identified an increase of total a-Syn levels in the caecum and colon following paraquat exposure of both wild-type and M83 transgenic mice.

The example of paraquat represents a quite different situation to that of the rotenone since it readily accumulates into the brain after oral exposure (Prasad *et al.*, 2009). Regarding implications of these observations to the knowledge of the etiology of synucleinopathies, it should be emphasized that PD is only a subset of these diseases. The pathogenesis of other synucleinopathies with earlier cortical involvement such as dementia with Lewy bodies is still less clear, as well as their etiology (Galasko, 2017). Moreover, besides synucleinopathies, the contribution of a-Syn changes to human neurodegenerative diseases has also been recently emphasized with mounting evidence that cerebral accumulation of soluble oligomeric a-Syn forms was tightly associated with cognitive impairment in Alzheimer's disease (Larson *et al.*, 2017; Larson *et al.*, 2012). This reinforces the need of further experimental studies about the possible contribution of environmental factors to a-Syn changes, keeping in mind that,

beside PD, the relationship between pesticides exposures and cognitive decline has also been repeatedly reported by epidemiological studies (Baldi *et al.*, 2011; Blanc-Lapierre *et al.*, 2013; Ismail *et al.*, 2012).

Our study gives new insights in the effect of low dose oral exposure to paraquat on a-Syn levels in two mouse lines. Also, we provide here the basis of a useful and easily manageable experimental model for further studies of pesticides effects in relation with the a-Syn protein.

ACKNOWLEDGEMENT

Nicolas Naudet was supported by Région Auvergne Rhône Alpes – ARC 3. Authors would like to thank Emilie Antier, Damien Gaillard and Coralie Pulido for their involvement in the mouse care, and Cyril Curtis for his help with the manuscript.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1:

A-Syn distribution in the brain and intestine of C57Bl/6 wild-type and M83 unexposed transgenic mice. a-Syn was detected in 7 regions of the brain and in 5 regions of the intestine, representing the whole organs, with 2 antibodies, C20-R, a C-terminal antibody and clone 42 (C42), recognizing the 91-96 sequence of a-Syn protein. Each frame is positioned at ~18 kDa, where a-Syn appears under a monomeric form. C57Bl/6 brains: 200 µg tissue equivalent per lane and exposed 20 seconds, intestines: 3 mg of tissue equivalent per lane and exposed 1 hour. M83 brains: 40 µg tissue equivalent per lane and exposed 30 seconds, intestines: 200 µg tissue equivalent per lane and exposed 60 seconds. Stain-free gels, used to control that equivalent quantities of proteins were loaded in each lane, are

shown in supplemental figure 1. OB: olfactory bulbs, CTX: cerebral cortex, HIP: hippocampus, STR: striatum, MES: mesencephalon, CBM: cerebellum, BS: brainstem, DUO: duodenum, JEJ: jejunum, ILE: Ileum, CAE: caecum, COL: colon, KO: samples from the whole brain, caecum or colon derived from mice which do not express murine a-Syn.

Figure 2:

Oral exposure to paraquat increases murine a-Syn levels throughout the brain and in the caecum and colon of C57Bl/6 mice. A-B ELISA was performed on brain and intestine homogenates (C57Bl/6 – brain: 1/500 – intestine: 1:10), using clone 42 antibody for capture (1/2000) and C20-R antibody for detection (1/10000), measuring levels of murine a-Syn. Each point represents the mean OD measured from three repetitions for each exposed (red plots) or unexposed (green plots) mouse in each of the brain (A) or intestine (B) regions examined. Purple dots represent the samples that were selected for the Western blot analysis shown in Figure 1. C - Correlation circle of MFA. D – Representation of the hierarchical clustering on the factorial map.

Figure 3:

Oral exposure to paraquat increases human a-Syn levels throughout the brain and in the caecum and colon of M83 transgenic mice. A-B ELISA was performed on brain and intestine homogenates (M83 – brain: 1:5000 – intestines: 1:500), using clone 42 antibody for capture (1/2000) and C20-R antibody for detection (1/10000), measuring levels of human a-Syn. Each point represents the mean OD measured from three repetitions for each exposed (red plots) or unexposed (green plots) mouse in each of the brain (A) or intestine (B) regions examined. Purple dots represent M83 mouse selected for the Western blot analysis shown in Figure 1.

C - Correlation circle of MFA. D – Representation of the hierarchical clustering on the factorial map.

Supplemental figure 1:

Visualization of protein loads in each lane of Western blot shown in figure 1. Proteins were visualized using the BioRad Stain Free technique using 12% gels, a method replacing Ponceau Red staining. Gels were activated by UV for 1 minute and protein auto-fluorescence was detected by Chemidoc apparatus.

Supplemental figure 2:

Oral exposure to paraquat increases murine a-Syn levels throughout the cerebellum, mesencephalon and brain stem of C57Bl/6 mice. ELISA was performed on brain homogenates at 1/50 dilution, using clone 42 antibody for capture (1/2000) and C20-R antibody for detection (1/10000), measuring levels of murine a-Syn. Each point represents the mean OD measured from three repetitions for each exposed (red plots) or unexposed (green plots) mouse in each part of the brain examined.

Supplemental figure 3:

Statistical analyses of a-Syn level between PQ-exposed and control mice using Mann-Whitney test.

References:

- Aldecoa, I., Navarro-Otano, J., Stefanova, N., Sprenger, F.S., Seppi, K., Poewe, W., Cuatrecasas, M., Valldeoriola, F., Gelpi, E., Tolosa, E., 2015. Alpha-synuclein immunoreactivity patterns in the enteric nervous system. Neurosci Lett 602, 145-149.

- Allen, M.T., Levy, L.S., 2013. Parkinson's disease and pesticide exposure--a new assessment. Crit Rev Toxicol 43, 515-534.

- Arnhold, M., Dening, Y., Chopin, M., Arevalo, E., Schwarz, M., Reichmann, H., Gille, G., Funk, R.H., Pan-Montojo, F., 2016. Changes in the sympathetic innervation of the gut in rotenone treated mice as possible early biomarker for Parkinson's disease. Clin Auton Res 26, 211-222.

- Ascherio, A., Schwarzschild, M.A., 2016. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. Lancet Neurol 15, 1257-1272.

- Baldi, I., Gruber, A., Rondeau, V., Lebailly, P., Brochard, P., Fabrigoule, C., 2011. Neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: results from the 4-year follow-up of the PHYTONER study. Occup Environ Med 68, 108-115.

- Baltazar, M.T., Dinis-Oliveira, R.J., de Lourdes Bastos, M., Tsatsakis, A.M., Duarte, J.A., Carvalho, F., 2014. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach. Toxicol Lett 230, 85-103.

- Bécue-Bertaut, M., Pagès, J., 2008. Multiple factor analysis and clustering of a mixture of quantitative, categorical and frequency data. Computational Statistics & Data Analysis 52, 3255-3268.

- Betemps, D., Verchere, J., Brot, S., Morignat, E., Bousset, L., Gaillard, D., Lakhdar, L., Melki, R., Baron, T., 2014. Alpha-synuclein spreading in M83 mice brain revealed by detection of pathological alpha-synuclein by enhanced ELISA. Acta Neuropathol Commun 2, 29.

- Betemps, D., Verchere, J., Mougenot, A.L., Lachmann, I., Morignat, E., Antier, E., Lakhdar, L., Legastelois, S., Baron, T., 2015. Detection of Disease-associated alpha-synuclein by Enhanced ELISA in the Brain of Transgenic Mice Overexpressing Human A53T Mutated alpha-synuclein. J Vis Exp, e52752.

- Blanc-Lapierre, A., Bouvier, G., Gruber, A., Leffondre, K., Lebailly, P., Fabrigoule, C., Baldi, I., 2013. Cognitive disorders and occupational exposure to organophosphates: results from the PHYTONER study. Am J Epidemiol 177, 1086-1096.

- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H., Del Tredici, K., 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell Tissue Res 318, 121-134.

- Burre, J., Sharma, M., Sudhof, T.C., 2017. Cell Biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein. Cold Spring Harb Perspect Med.

- Chartier-Harlin, M.C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., Destee, A., 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. Lancet 364, 1167-1169.

- Cristovao, A.C., Guhathakurta, S., Bok, E., Je, G., Yoo, S.D., Choi, D.H., Kim, Y.S., 2012. NADPH oxidase 1 mediates alpha-synucleinopathy in Parkinson's disease. J Neurosci 32, 14465-14477.

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

- Fernagut, P.O., Hutson, C.B., Fleming, S.M., Tetreaut, N.A., Salcedo, J., Masliah, E., Chesselet, M.F., 2007. Behavioral and histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: effects of alpha-synuclein over-expression. Synapse 61, 991-1001.

- Galasko, D., 2017. Lewy Body Disorders. Neurol Clin 35, 325-338.

- George, S., Mok, S.S., Nurjono, M., Ayton, S., Finkelstein, D.I., Masters, C.L., Li, Q.X., Culvenor, J.G., 2010. alpha-Synuclein transgenic mice reveal compensatory increases in Parkinson's disease-associated proteins DJ-1 and parkin and have enhanced alpha-synuclein and PINK1 levels after rotenone treatment. J Mol Neurosci 42, 243-254.

- Giasson, B.I., Duda, J.E., Quinn, S.M., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2002. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. Neuron 34, 521-533.

- Goldman, S.M., 2014. Environmental toxins and Parkinson's disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol 54, 141-164.

- Hawkes, C.H., Del Tredici, K., Braak, H., 2007. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. Neuropathol Appl Neurobiol 33, 599-614.

- Hu, Q., Uversky, V.N., Huang, M., Kang, H., Xu, F., Liu, X., Lian, L., Liang, Q., Jiang, H., Liu, A., Zhang, C., Pan-Montojo, F., Zhu, S., 2016. Baicalein inhibits alpha-synuclein oligomer formation and prevents progression of alpha-synuclein accumulation in a rotenone mouse model of Parkinson's disease. Biochim Biophys Acta 1862, 1883-1890.

- 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., 2007. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. J Neurochem 101, 1491-1504.

- Ismail, A.A., Bodner, T.E., Rohlman, D.S., 2012. Neurobehavioral performance among agricultural workers and pesticide applicators: a meta-analytic study. Occup Environ Med 69, 457-464.

- Kasten, M., Klein, C., 2013. The many faces of alpha-synuclein mutations. Mov Disord 28, 697-701.

- Klein, C., Westenberger, A., 2012. Genetics of Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med 2, a008888.

- Klingelhoefer, L., Reichmann, H., 2015. Parkinson's Disease and Gastrointestinal Non Motor Symptoms: Diagnostic and Therapeutic Options - A Practise Guide. J Parkinsons Dis 5, 647-658.

- Larson, M.E., Greimel, S.J., Amar, F., LaCroix, M., Boyle, G., Sherman, M.A., Schley, H., Miel, C., Schneider, J.A., Kayed, R., Benfenati, F., Lee, M.K., Bennett, D.A., Lesne, S.E., 2017. Selective lowering of synapsins induced by oligomeric alpha-synuclein exacerbates memory deficits. Proc Natl Acad Sci U S A 114, E4648-E4657.

- Larson, M.E., Sherman, M.A., Greimel, S., Kuskowski, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Lesne, S.E., 2012. Soluble alpha-synuclein is a novel modulator of Alzheimer's disease pathophysiology. J Neurosci 32, 10253-10266.

- Malkus, K.A., Ischiropoulos, H., 2012. Regional deficiencies in chaperone-mediated autophagy underlie alpha-synuclein aggregation and neurodegeneration. Neurobiol Dis 46, 732-744.

- Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., Di Monte, D.A., 2002. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. J Biol Chem 277, 1641-1644.

- Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Purisai, M.G., Bolin, L.M., Di Monte, D.A., 2003. Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. J Neurosci 23, 3095-3099.

- Mitra, S., Chakrabarti, N., Bhattacharyya, A., 2011. Differential regional expression patterns of alpha-synuclein, TNF-alpha, and IL-1beta; and variable status of dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after Paraquat treatment. J Neuroinflammation 8, 163.

- Norris, E.H., Uryu, K., Leight, S., Giasson, B.I., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2007. Pesticide exposure exacerbates alpha-synucleinopathy in an A53T transgenic mouse model. Am J Pathol 170, 658-666.

- Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., Knels, L., Pursche, S., Jung, R., Jackson, S., Gille, G., Spillantini, M.G., Reichmann, H., Funk, R.H., 2010. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. PLoS One 5, e8762.

- Pan-Montojo, F., Schwarz, M., Winkler, C., Arnhold, M., O'Sullivan, G.A., Pal, A., Said, J., Marsico, G., Verbavatz, J.M., Rodrigo-Angulo, M., Gille, G., Funk, R.H., Reichmann, H., 2012. Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. Sci Rep 2, 898.

- Perez-Pardo, P., Dodiya, H.B., Broersen, L.M., Douna, H., van Wijk, N., Lopes da Silva, S., Garssen, J., Keshavarzian, A., Kraneveld, A.D., 2017. Gut-brain and brain-gut axis in Parkinson's disease models: Effects of a uridine and fish oil diet. Nutr Neurosci, 1-12.

- 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.

- Prasad, K., Tarasewicz, E., Mathew, J., Strickland, P.A., Buckley, B., Richardson, J.R., Richfield, E.K., 2009. Toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat accumulation in mouse brain. Exp Neurol 215, 358-367.

- R Development Core Team, 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Austria.

- Saito, Y., Shioya, A., Sano, T., Sumikura, H., Murata, M., Murayama, S., 2016. Lewy body pathology involves the olfactory cells in Parkinson's disease and related disorders. Mov Disord 31, 135-138.

- Singleton, A.B., 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, M.R., Muenter, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy, K., 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science 302, 841.

- Soldner, F., Stelzer, Y., Shivalila, C.S., Abraham, B.J., Latourelle, J.C., Barrasa, M.I., Goldmann, J., Myers, R.H., Young, R.A., Jaenisch, R., 2016. Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of alpha-synuclein modulates target gene expression. Nature 533, 95-99.

- Specht, C.G., Schoepfer, R., 2001. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. BMC Neurosci 2, 11.

- Tasselli, M., Chaumette, T., Paillusson, S., Monnet, Y., Lafoux, A., Huchet-Cadiou, C., Aubert, P., Hunot, S., Derkinderen, P., Neunlist, M., 2013. Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. Neurogastroenterol Motil 25, e183-193.

- Traore, T., Bechaux, C., Sirot, V., Crepet, A., 2016. To which chemical mixtures is the French population exposed? Mixture identification from the second French Total Diet Study. Food Chem Toxicol 98, 179-188.

- Tsika, E., Moysidou, M., Guo, J., Cushman, M., Gannon, P., Sandaltzopoulos, R., Giasson, B.I., Krainc, D., Ischiropoulos, H., Mazzulli, J.R., 2010. Distinct region-specific alpha-synuclein oligomers in A53T transgenic mice: implications for neurodegeneration. J Neurosci 30, 3409-3418.

- Visanji, N., Marras, C., 2015. The relevance of pre-motor symptoms in Parkinson's disease. Expert Rev Neurother 15, 1205-1217.

- Visanji, N.P., Brooks, P.L., Hazrati, L.N., Lang, A.E., 2013. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. Acta Neuropathol Commun 1, 2.

- Wills, J., Credle, J., Oaks, A.W., Duka, V., Lee, J.H., Jones, J., Sidhu, A., 2012. Paraquat, but not maneb, induces synucleinopathy and tauopathy in striata of mice through inhibition of proteasomal and autophagic pathways. PLoS One 7, e30745.

Figure

Click here to download Figure: Neurotoxicology_Figures_2017_09_05.pptx

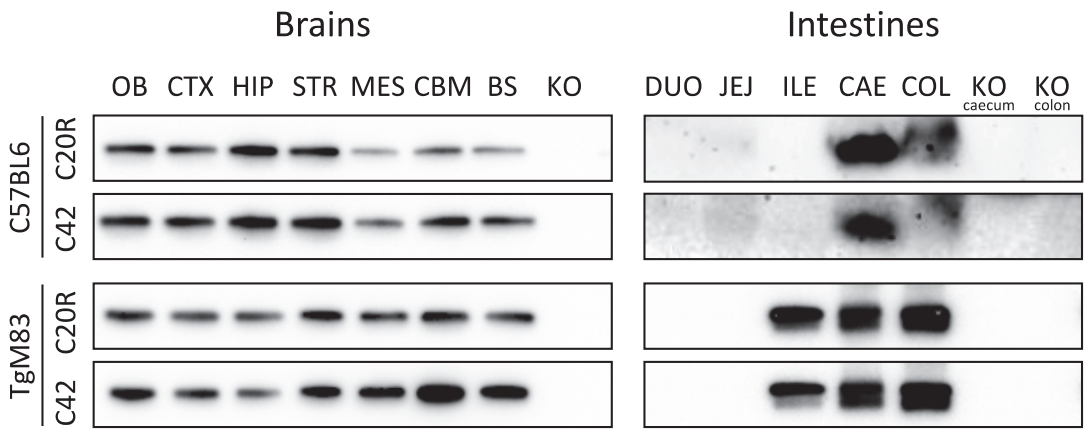


Figure 1

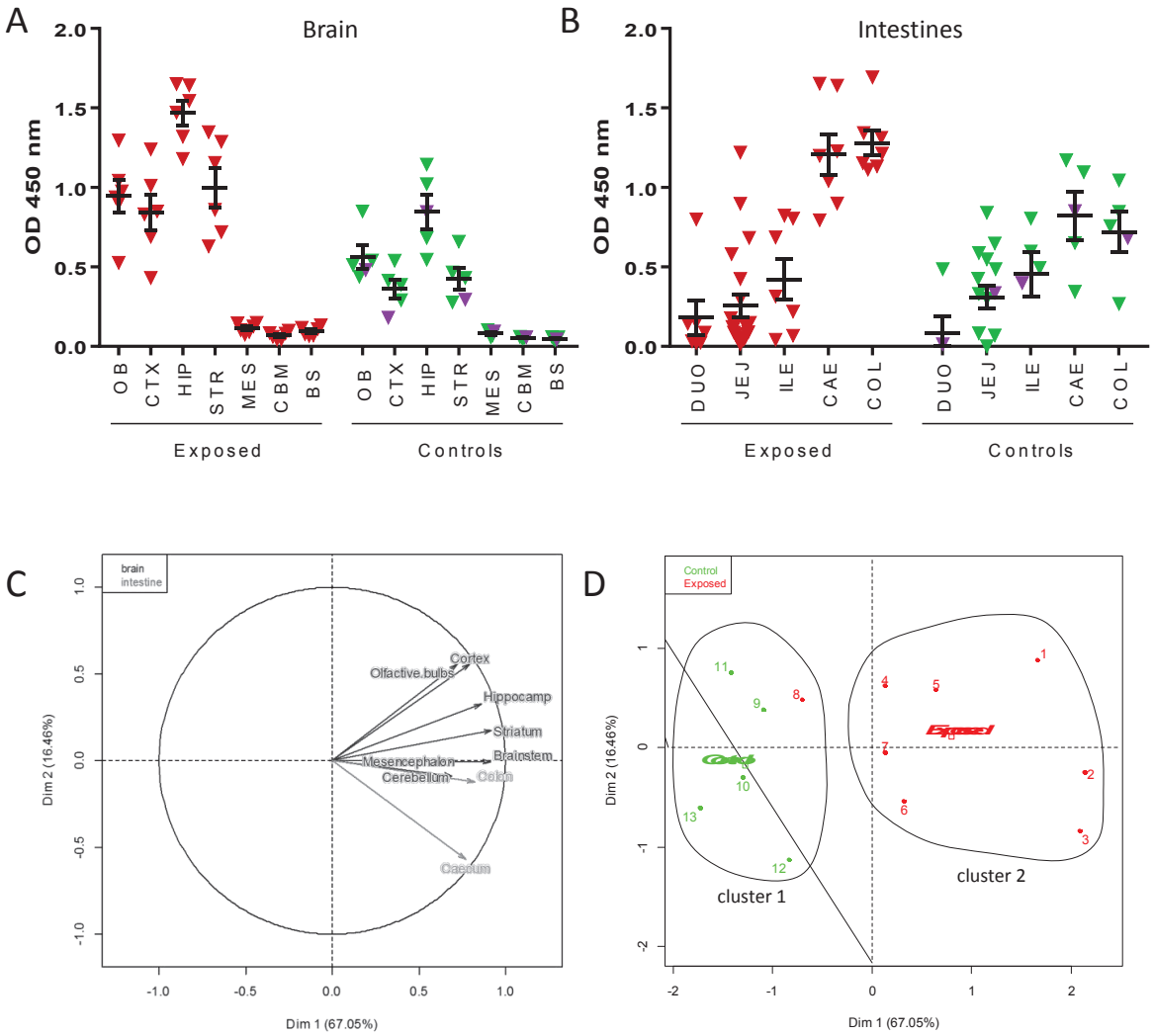

A
Brain
OD 450 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OB
CTX
HIP
STR
MES
CBM
BS
Exposed
Controls
B
Intestines
DUO
JEJ
ILE
CAE
COL
C
brain
intestine
Olfactive.bulbs
Cortex
Hippocamp
Striatum
Mesencephalon
Brainstem
Cerebellum
Colon
Caecum
Dim 1 (67.05%)
Dim 2 (16.46%)
D
Control
Exposed
cluster 1
cluster 2

Figure 2

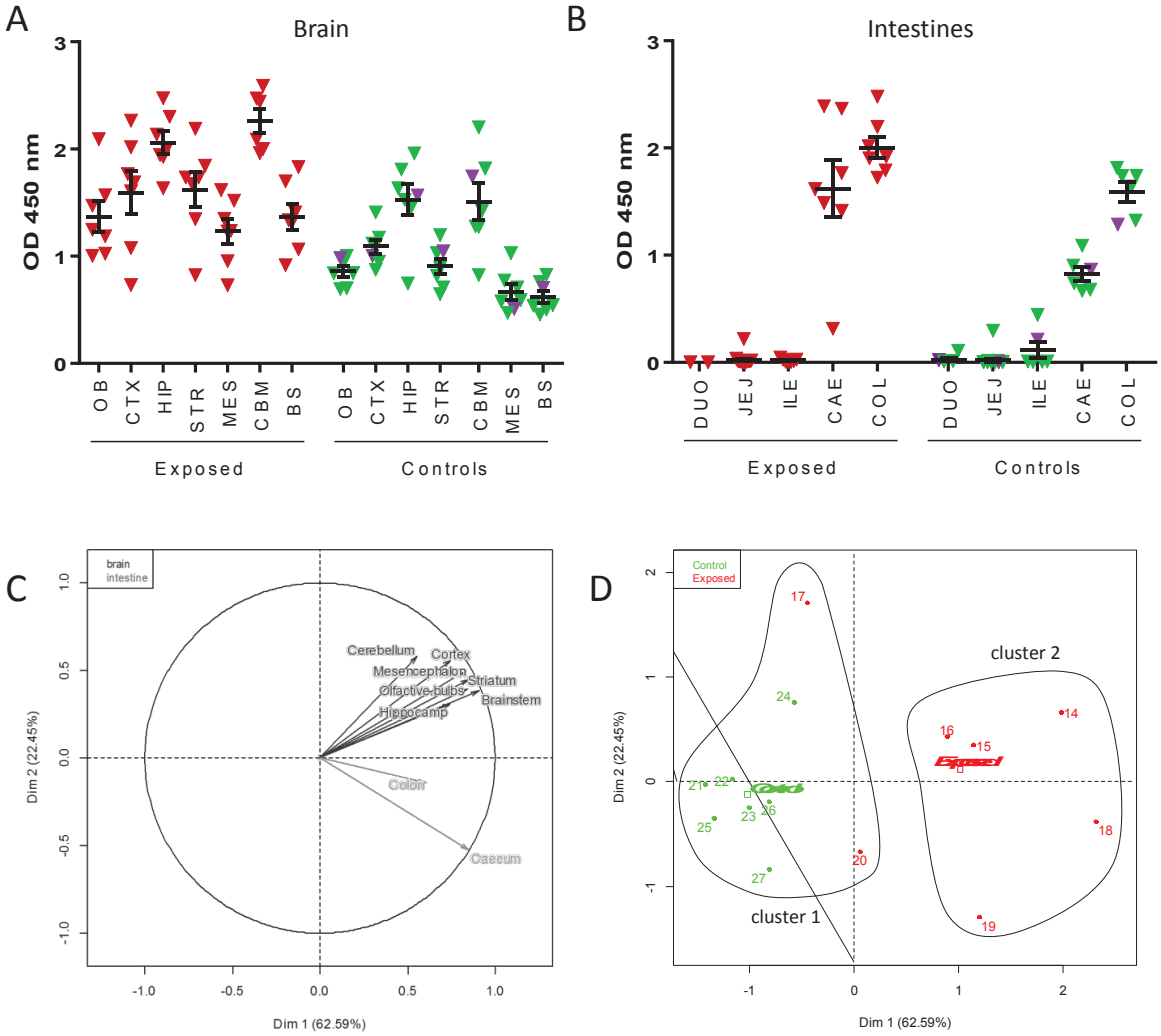

A
Brain
OD 450 nm
OB
CTX
HIP
STR
MES
CBM
BS
Exposed
Controls
B
Intestines
DUO
JEJ
ILE
CAE
COL
C
brain
intestine
Cerebellum
Cortex
Mesencephalon
Striatum
Olfactive bulbs
Brainstem
Hippocamp
Colon
Caecum
Dim 1 (62.59%)
Dim 2 (22.45%)
D
Control
Exposed
cluster 1
cluster 2

Figure 3

Discussion et perspectives

Résumé des points clés

- La voie d'administration orale au paraquat à la dose de 10 mg/kg/j par l'eau de boisson est mieux tolérée que le gavage.
- L'exposition orale à la dose de 10 mg/kg/j au paraquat accélère une synucléinopathie dans le SNE d'une souris transgénique.
- Les niveaux d'α-syn totale sont augmentés d'au moins 30% dans le SNC et le SNE suite à l'exposition au paraquat par voie orale dans un modèle transgénique parkinsonien mais aussi dans un modèle sauvage.
- Nous proposons ici un test d'évaluation de la toxicité de substances chimiques en lien avec la MP mesurant la capacité de la substance en question à augmenter les niveaux cellulaires d'α-syn.

Discussion

L'unité Maladies NeuroDégénératives (MND) de l'ANSES de Lyon, dans laquelle ma thèse s'est déroulée est focalisée sur les maladies à mépliment protéique. Depuis le déclin des activités liées aux maladies à prion, l'unité MND a entrepris l'élargissement de ses champs de recherches vers d'autres maladies neurodégénératives depuis le début des années 2010. Dans un contexte où le mécanisme « prion-like » de l'α-syn est d'actualité, cette protéine a été un candidat idéal pour focaliser une partie des recherches de l'unité, notamment en lien avec la maladie de Parkinson. De plus, dans un objectif plus large, inhérent aux missions de l'ANSES, cette agence évalue l'impact de l'environnement sur la santé pour mieux identifier les risques sanitaires liés aux pollutions des milieux de vie tels quel l'eau, l'air ou les sols. Aussi, depuis l'année 2015, l'ANSES s'est vue confier de nouvelles activités dans l'évaluation avant de délivrer une autorisation de mise sur la marché (AMM) des produits phytopharmaceutiques, matières fertilisantes et supports de culture, de leurs

adjuvants, et des biocides ; plus récemment, l'ANSES s'est vue confier la coordination de la toxicovigilance française.

Le sujet de ma thèse concerne donc plusieurs aspects thématiques liés à cette agence, tant dans l'étude des mécanismes biologiques précis impliqués dans l'initiation de la MP, que dans l'évaluation de l'impact d'expositions environnementales de la population à des substances neurotoxiques.

L'implication du système nerveux entérique dans la MP ne fait plus aucun doute parmi la communauté scientifique, tant par les désordres intestinaux identifiés dans la majorité des patients atteints de la MP ou/et par la présence de corps de Lewy dans le SNE de ces patients. Ces CL sont composés principalement d'α-syn, protéine majeure impliquée dans la pathophysiologie de la MP. Deux théories existent concernant l'initiation de la MP (Braak *et al.*, 2006; Braak *et al.*, 2003; Engelender et Isacson, 2017; Hawkes *et al.*, 2007). Cependant, ces théories ne sont pas diamétralement opposées et font état toutes les deux de l'implication du système nerveux entérique. La MP comporte deux étiologies différentes : les cas familiaux et les cas idiopathiques. Les cas familiaux sont dus à des défauts génétiques tels que des mutations ou des multiplications du gène SNCA codant l'α-syn. En lien avec les formes idiopathiques de la MP, l'exposition à des substances telles que les pesticides représentent un des facteurs de risque majeur de ces formes. Aussi, plusieurs pesticides sont reconnus comme des initiateurs probables de la MP, à savoir le paraquat et la roténone. Ces pesticides ont été liés épidémiologiquement au déclenchement précoce de la maladie et ceci est corroboré par des études expérimentales *in vivo* et *in vitro*. Ils sont ainsi des substances de référence dans l'étude des pathologies liées à l'α-syn (synucléinopathies)

Nos études montrent que le paraquat a un effet clair sur l'α-syn consécutivement à son exposition orale, chronique et à faible dose chez la souris. Nous montrons l'accélération d'une synucléinopathie dans le système nerveux entérique présent dans l'intestin d'une souris transgénique développant spontanément un synucléinopathie, le modèle TgM83. Ceci se traduit par l'apparition précoce de la forme phosphorylée de l'α-syn dans les plexus myentériques des souris exposées. D'autre part, nous montrons aussi l'augmentation générale des niveaux d'α-syn tant au niveau cérébral qu'au niveau entérique, traduisant un

mécanisme d'implication possible de ce composé dans l'initiation de synucléinopathies telles que la MP.

Choix d'une modalité d'exposition orale au paraquat

L'exposition par voie orale à un pesticide peut se faire par différentes modalités. Parmi ces modalités d'expositions nous en avons sélectionné deux pour les éprouver *in vivo*, afin d'en sélectionner la plus appropriée. Dans une première étude, deux modalités d'exposition par voie orale à un pesticide soluble ont été comparées : l'exposition par gavage intra gastrique et l'exposition par l'eau de boisson.

Les résultats que nous avons obtenus montrent clairement que l'exposition par l'eau de boisson est la modalité d'exposition la mieux supportée, avec ses avantages et ses inconvénients. Ses avantages sont nombreux, cette voie est parfaitement tolérée par les souris, elle n'engendre aucune mortalité et la prise de poids des souris est constante. Toutefois, l'inconvénient majeur de cette voie est que la dose administrée à la souris n'est pas précisément connue. En effet, seule une dose théorique journalière peut être calculée, en se basant sur les volumes théoriques de consommation d'eau. Ces constantes ont été étudiées et sont connues pour plusieurs lignées de souris (Bachmanov *et al.*, 2002), ce qui nous a permis de monter un schéma d'exposition à des doses théoriques relativement précises. Pour la souris C57Bl/6, la consommation d'eau quotidienne est de 7,5 ml/30 g, correspondant ainsi à une consommation journalière de 4mL pour des souris jeunes de 16 grammes. Par contre, il est aisément imaginable que les phénomènes de domination entre les souris peuvent conduire celles-ci à avoir un apport en eau différent au sein d'une même cage, menant à des différences individuelles d'exposition au sein des lots. L'exposition par gavage présente plusieurs inconvénients majeurs en termes de manipulation et en termes de résultats. En effet, cette modalité d'exposition est astreignante et oblige la manipulation quotidienne des individus, représentant une charge de travail conséquente pour l'opérateur et un stress pour l'animal étant donné le caractère invasif de l'administration par sonde intragastrique. Aussi, cette modalité d'administration mène à plus de 30% de perte d'individus aux doses de 10 et de 20 mg/kg/jour. Cependant l'avantage de cette voie

d'administration est la parfaite maîtrise de la dose quotidienne des souris, indépendamment des variations sociales présentes dans les cages des souris.

Même si ces deux modes d'exposition sont chroniques et à faible dose, la répartition de la prise du pesticide sur la journée est quelque peu différente selon la modalité d'exposition. Le gavage pourrait s'apparenter à l'administration « aigue » de la dose journalière (de façon discontinue) alors que l'eau de boisson représente une prise continue, étalée sur la journée, sachant qu'une souris s'abreuve entre 15 et 20 fois par jour en moyenne, fractionnant considérablement la dose. Ceci pourrait en partie expliquer la mortalité rencontrée dans les deux plus fortes doses de l'administration par gavage, où la dose administrée pourrait être trop forte. Le paraquat ayant un pouvoir oxydant fort, ceci pourrait mener à des irritations des muqueuses buccales et gastro-intestinales. Cependant, une autopsie de plusieurs souris trouvées mortes n'a pas permis de révéler de lésions macroscopiques apparentes dues à des irritations imputables au pesticide ou à l'introduction de la sonde de gavage.

Une autre voie d'administration pourrait cependant être intéressante à mettre en place. En effet, l'exposition par l'eau de boisson à un pesticide ne peut se faire qu'avec un pesticide soluble, celui-ci étant dissout directement dans l'eau de boisson, or la majorité des pesticides ont une solubilité relativement faible dans les milieux aqueux. Le gavage intra-gastrique permet d'administrer un pesticide insoluble par voie orale, en le mettant en suspension dans une matrice gélifiée, en utilisant par exemple du carboxymethylcellulose à 4%, comme montré précédemment par Pan Montojo et collègues (Pan-Montojo et Funk, 2010). Cependant l'administration par gavage ne permettrait pas d'administrer des pesticides à forte dose sans entraîner une perte de souris. L'alternative permettant l'administration chronique étalant la dose quotidienne sur la journée pour un pesticide insoluble pourrait se faire en préparant des aliments additionnés du pesticide insoluble de façon homogène. Une étude a déjà utilisé un tel type d'administration similaire pour le paraquat, en mélangeant le pesticide avec une poudre alimentaire (Minnema *et al.*, 2014). Ainsi, la dose serait répartie sur la journée lors de l'alimentation des souris, réduisant ainsi le risque de développer des effets délétères dus au rythme d'administration du pesticide.

Les modalités d'administration à des pesticides sont variées et répondent chacune à un besoin précis, selon les propriétés intrinsèques des substances analysées et selon le type d'études prévues.

Il est à noter que dans nos études nous avons soumis la totalité de nos souris, contrôles et témoins, à des tests de performance motrice de façon hebdomadaire pour étudier les effets moteurs de l'administration du paraquat chez les souris. Deux types de tests par Rotarod ont ainsi été menés : le test d'endurance, où la souris est placée sur la barre rotative à une vitesse de 20 tours par minutes pendant 5 minutes et le test d'accélération où la souris est placée sur la barre rotative dont la vitesse de départ est de 2 tours par minutes, puis celle-ci s'incrémente de 1 tour par minutes toutes les 3 secondes. Nous résultats ne montrent aucune déficience motrice due à l'administration du composé, les lots témoins n'étant pas significativement différents des lots exposés.

Distribution physiologique de l'a-synucléine

Nos résultats présentés dans l'article n°2 permettent d'étudier la distribution physiologique de l'α-syn « totale », c'est-à-dire prenant en compte les formes non phosphorylées et phosphorylées, dans le SNE et le SNC de nos deux lignées murines utilisées pendant la thèse.

Le couple d'anticorps utilisé dans l'ELISA « *Sandwich* » est décrit comme hautement sensible et spécifique de l'α-syn humaine et murine (Emmanouilidou *et al.*, 2011). Ce format d'ELISA détecte donc la forme humaine et la forme murine de l'α-syn exprimée dans le modèle transgénique TgM83. Cependant, dans nos expérimentations de mise en place de ce protocole, nous constatons qu'aux dilutions des quantités de tissus analysées, ce test ne détecte que la forme humaine surexprimée de la protéine. Il est à noter que ce test ne permet pas de discriminer une souris malade d'une souris jeune indiquant qu'il ne reconnait pas une forme d'α-syn spécifique de la pathologie dans le modèle TgM83.

Concernant la distribution physiologique de l'α-syn, dans la lignée C57Bl/6, l'α-syn totale se distribue selon un axe rostro-caudal dans le cerveau, les bulbes olfactifs, le cortex cérébral, l'hippocampe et le striatum ont un niveau d'expression de l'α-syn homogène et

environ 20 fois plus élevé que le cervelet, le mésencéphale et le tronc cérébral. Dans l'intestin, depuis le duodénum jusqu'au colon, l'α-syn suit aussi une distribution rostro-caudale où le duodénum ne présente presque pas d'α-syn, le jéjunum une faible concentration, l'iléon relativement plus et le caecum un niveau d'α-syn élevé ainsi que le colon. Pour la lignée transgénique TgM83, les niveaux cérébraux d'α-syn totale sont à peu près équivalents dans toutes les zones, avec une plus forte concentration dans le cervelet et l'hippocampe ; dans le SNE, le caecum et le colon expriment de façon bien plus forte l'α-syn que les autres segments.

Depuis la détection des premiers corps de Lewy dans le système nerveux périphérique de patients parkinsoniens par Qualman en 1984, plusieurs équipes ont étudié le gradient de distribution des inclusions pathologiques liées à l'α-syn dans l'intestin par la suite (Braak *et al.*, 2006; Wakabayashi *et al.*, 1990; Wakabayashi *et al.*, 1988). Dans le SNE, le gradient de concentration en α-syn totale vu dans nos expérimentations est inversement corrélé à ce qui est décrit pour les corps de Lewy chez l'homme. En effet, dans le tractus gastro-intestinal humain, il est montré par des biopsies entériques qu'il y a un gradient rostro-caudal de diminution de la fréquence et de la densité en α-syn phosphorylée, l'œsophage inférieur et la glande sous-mandibulaire ayant la plus forte concentration en α-syn pathologique et la partie colorectale la plus faible (Beach *et al.*, 2010a).

Le devenir du paraquat suivant l'ingestion

L'un des points clé dans la toxicité du paraquat réside dans sa faculté à traverser la BHE, ceci a été attesté par plusieurs études, cette entrée dans le cerveau se ferait à l'aide de transporteurs d'acide aminés (Corasaniti *et al.*, 1991; Shimizu *et al.*, 2001; Tawara *et al.*, 1996). En plus de pouvoir infiltrer le cerveau, le paraquat pourrait être transporté jusque dans la mitochondrie, comme il a été montré ex-vivo dans des mitochondries extraites de cerveaux de rats, par un transport sodium-dépendant (Tawara *et al.*, 1996). Après l'ingestion, le paraquat se retrouve dans le système sanguin, mais il n'est pas métabolisé, il est conservé intact jusqu'à son entrée dans la mitochondrie où il va subir une oxydoréduction. Pour ce faire, il est réduit en un radical libre instable, qui est ensuite oxydé

pour reformer l'ion paraquat. Cette réaction produit un anion superoxyde, générateur de stress oxydant.

Il est maintenant bien établi que l'oxydoréduction est la principale réaction responsable de la toxicité du paraquat. Pour ce qui est de cette réaction en détail, dans des conditions anaérobiques, l'ion paraquat (dication PQ2+) peut être réduit par la NADPH, principalement au niveau de la mitochondrie, formant ainsi un radical réduit et instable (DeGray *et al.*, 1991). Celui-ci réagit alors avec l'oxygène moléculaire pour reformer l'ion paraquat et il se dégage de cette réaction un ion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), générateur de stress oxydant. Le dication paraquat (PQ^{2+}) reformé par sa réaction avec l'oxygène, il peut donc entreprendre un nouveau cycle d'oxydoréduction, et ainsi de suite (Smith, 1987). Le paraquat est donc un générateur puissant et continu de stress oxydant au sein de la cellule.

L'autre élément à prendre en compte concernant l'exposition au paraquat est sa capacité à s'accumuler dans différentes structures, notamment dans des structures cérébrales. Il a déjà été montré chez des souris la bioaccumulation dose dépendante et linéaire du paraquat dans le mésencéphale, suivant une injection intra péritonéale ou dans le striatum suivant une ingestion par l'eau de boisson (Prasad *et al.*, 2009; Prasad *et al.*, 2007). Aussi, dans la lignée C57Bl/6, cette étude a montré que la demi-vie du paraquat après une seule injection de 10 mg/kg est d'environ un mois. Le paraquat possède donc une demi-vie relativement longue d'un mois dans le mésencéphale de souris, ceci couplé à une génération d'ion superoxyde en continu induisant un stress oxydant intracellulaire. Cette génération de stress oxydant, sous forme de dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species)*, induit des défauts dans la cellule, à savoir des défauts mitochondriaux (Grabie *et al.*, 1993).

Dans de prochaines études, l'ajout de la quantification de marqueurs spécifiques du stress oxydant, comme les facteurs iNOS, NOX, pourrait être un atout pour attester de la génération d'un stress oxydant par le composé utilisé. Aussi, des marqueurs clés de la chaine respiratoire mitochondriale pourraient être étudiés afin de voir si le paraquat induit bien un blocage de cette voie cellulaire.

Les effets du paraquat sur l'a-synucléine

Dans notre étude histologique nous montrons l'exacerbation d'une synucléinopathie dans le SNE d'un modèle transgénique murin de synucléinopathie, la souris TgM83, exprimant la protéine α-syn humaine mutée au niveau du résidu 53 (A53T), mutation retrouvée dans des formes familiales de la MP. Aussi, par des études biochimiques nous montrons l'augmentation générale des niveaux d'α-syn totale (non phosphorylée et phosphorylée) dans deux lignées murines, TgM83 et sauvage. Nos deux études, histologiques et biochimiques sont complémentaires, l'une étudie l'expression de l'α-syn phosphorylée dans le compartiment nerveux, l'autre étudie l'expression de l'α-syn totale. La base expérimentale commune entre ces deux études étant la voie d'exposition orale au paraquat

Il est assez difficile de mettre en relation nos résultats avec des résultats disponibles dans la littérature, en effet, la voie d'exposition orale au paraquat est assez peu utilisée pour induire des effets délétères chez la souris. La différence entre l'exposition par voie orale et l'exposition par voie systémique réside principalement par le passage de la barrière intestinale, à l'interface de laquelle des éléments complémentaires tels que le microbiote intestinal ou la protection offerte par le mucus pourraient jouer un rôle important dans l'étude de l'impact de l'exposition à ce composé. Ainsi, les effets du paraquat ont essentiellement été étudiés expérimentalement après des injections systémiques dans des modèles murins. Des études antérieures ont montré que le paraquat s'accumule facilement dans le cerveau après une exposition subchronique de souris par voie orale, par la même modalité que nous utilisons, de plus, cette accumulation est dose dépendante (Prasad et al., 2009). Ceci apporte plusieurs éléments d'information clés dans la compréhension du mode d'action du paraquat, d'une part il est capable de circuler depuis le système digestif jusqu'au SNC, d'autre part la bioaccumulation dose dépendante de ce composé montre que ses effets délétères peuvent perdurer à moyen terme.

Notre test ELISA nous permet d'étudier quantitativement les niveaux d'α-syn présents dans chaque région cérébrale ou intestinale, relativement au lot non-exposé au pesticide. Nos données ont montré que l'exposition au paraquat provoque une augmentation généralisée des taux d'α-syn dans toutes les régions du cerveau examinées et

dans les parties distales de l'intestin, dans les deux lignées murines étudiées. Un tel effet a déjà été rapporté dans certaines études après l'injection systémique du pesticide de référence dans des lignées de souris et de rats sauvages. Cependant, ces études se sont généralement focalisées sur la substance noire ou le mésencéphale (Manning Bog et al., 2002) ou sur le striatum (Wills et al., 2012). De plus, il est montré que la réponse cellulaire d'induction de l'expression de l'α-syn pourrait être transitoire après l'injections de paraquat (Manning-Bog et al., 2002). Dans la plupart des cas, l'injection systémique de paraquat induit l'agrégation intraneuronale de l'α-syn, ainsi que sa surexpression. Particulièrement, il est montré par Western Blot spécifique de la forme humaine de l'α-syn, qu'une exposition systémique au paraquat chez la souris TgM83 induit une augmentation des niveaux d'α-syn dans le mésencéphale et dans le cortex (Norris *et al.*, 2007), ce qui est totalement en accord avec nos résultats vus par test ELISA, de plus, cet article montre que cette augmentation de concentration en α-syn est accompagnée par la création d'agrégats intracytoplasmiques d'α-syn. Dans une autre étude, un groupe a montré que l'exposition au paraquat par voie systémique à la dose de 10 mg/kg dans le même modèle murin, induit aussi une augmentation des niveaux d'α-syn dans le striatum de ces souris. D'ailleurs dans cette étude, le MPTP est administré en parallèle dans un autre lot et celui-ci induit les mêmes effets que le paraquat, renforçant l'idée que l'homologie structurelle entre ces deux molécules et qu'elles empruntent les mêmes voies de toxicité cellulaire. (Wills et al., 2012a).

Quel effet pourrait avoir une augmentation des niveaux cellulaires en α-syn ? Le taux d'α-syn endogène semble critique dans la pathogenèse de la MP. En effet, dans des cas familiaux de la MP, des duplications ou triplications du gène *SNCA*, menant à une augmentation des niveaux cellulaires d'α-syn, prédisposent à la MP (Chartier-Harlin *et al.*, 2004; Olgiati *et al.*, 2015). De plus, l'agressivité du phénotype semble liée au nombre de copies présentes dans ces formes héréditaires, car les individus présentant des triplications du gène ont un phénotype plus précoce plus agressif que ceux ayant une duplication. Plus récemment, des études associées au génome ont permis de montrer qu'une augmentation des niveaux cellulaires d'α-syn, même modeste, induisent un risque accru de développer une MP (Soldner *et al.*, 2016). Ceci montre l'importance de l'évaluation des quantités d'α-syn en conditions physiologiques et notamment en conditions pathologiques de stress oxydatif induit par le paraquat, où nous montrons par conséquent que celui-ci pourrait donc

induire un risque accru de développer une pathologie de l'α-syn dans nos deux modèles murins.

Dans notre étude histologique nous montrons l'accélération de la synucléinopathie spontanée induit par l'exposition par voie orale au paraquat. Ces résultats s'appuient sur une précédente étude de caractérisation de l'apparition de l'α-syn phosphorylée dans lignée transgénique TgM83. Cette souris transgénique développe une pathologie motrice à partir de 8 mois d'âge, caractérisée par une paralysie du train arrière. Dans l'étude précédente émanant de notre laboratoire, nous montrons que la souris TgM83 présente spontanément des dépôts d'α-syn phosphorylée en sérine S129 dans le cerveau et dans l'intestin simultanément. Dans le cerveau, un marquage nucléaire est observé à partir de 3,5 mois d'âge et ce marquage est cytoplasmique à partir de 5 mois d'âge. Dans l'intestin, l'α-syn pathologique est détectée elle aussi dès 3,5 mois d'âge, par des dépôts intracytoplasmiques vus dans les plexus myentériques de ces souris. Nous montrons par notre nouvelle étude que l'exposition au paraquat permet d'avancer la détection de l'α-syn pathologique S129 d'au moins 3 semaines, visible dès six semaines d'exposition, correspondant à un âge de 14 semaines, soit 3 mois d'âge ; des temps plus précoces n'ayant pas été réalisés. Cette expression est constante et persiste dans les points d'exposition 7 et 8 semaines. Notre étude ne nous permet pas d'étudier précisément la localisation topographique de l'α-syn sur les coupes d'intestin, cependant, le jéjunum étant la partie la plus longue de notre organe d'intérêt, nous pouvons supposer une prédominance des captures aléatoires de microphotographies dans cette zone. Dans le cerveau, nous ne voyons pas d'accélération de la pathologie dans les temps d'exposition considérés. À notre connaissance, aucune étude précédente n'étudie les effets du paraquat sur l'α-syn entérique. Dans un article publié par Pan-Montojo et collègues, les effets de la roténone administrée par gavage intragastrique sont étudiés. Cette étude porte sur la lignée C57Bl/6 où la roténone est administrée pendant 6 ou 12 semaines. Parmi d'autres résultats, il est montré que l'exposition orale à la roténone par voie intragastrique entraîne l'accumulation de l'α-syn phosphorylée S129 dans le SNE de l'intestin.

Dans notre étude biochimique nous montrons que l'administration du paraquat par voie orale module l'α-syn cérébrale et intestinale simultanément. Les effets particulièrement

ubiquitaires du paraquat pourraient s'expliquer par le fait que suite à son ingestion, le paraquat est circulant et peut se traverser la BHE. Or nous ne voyons pas d'accélération de la synucléinopathie dans le cerveau aux temps d'exposition menés, alors que l'intestin présente une forte accélération. Ces données suggèrent que l'intestin pourrait être plus sensible à l'ingestion d'une toxine extérieure que le cerveau, par son exposition directe à ces toxines. De plus, par rapport à l'exposition de la population générale, celle-ci se fait principalement par voie alimentaire. En première ligne de cette exposition alimentaire chez l'homme, l'étude du SNE permet donc une évaluation plus réaliste quant à l'exposition humaine à une substance en lien avec les mécanismes de toxicité cellulaire.

Dans le modèle C57Bl/6, l'α-syn phosphorylée n'est pas induite par l'exposition au paraquat dans ce délai d'exposition. Cependant, nous ne pouvons pas conclure à l'absence de toxicité suite à l'administration du paraquat dans les intestins des souris C57Bl/6 sur le seul critère de l'α-syn. En effet, les intestins de ces souris sauvages présentent une gliose réactionnelle, vue par l'augmentation significative des niveaux de GFAP dans les plexus myentériques. La courte durée d'exposition choisie pour ces expérimentations pourrait expliquer en partie l'absence d'α-syn S129 dans l'intestin de ces souris. Dans la lignée transgénique, les analyses immunohistochimiques du SNE révèlent elles aussi la surexpression de la GFAP dans le compartiment intestinal. Ces résultats montrent l'induction d'une gliose réactionnelle dans l'intestin suite à l'ingestion de paraquat. La gliose réactionnelle est une prolifération ou une hypertrophie de cellules gliales en réponse à un stress. Bien qu'elle puisse être associée à l'inflammation, la GFAP n'est pas un marqueur d'inflammation. Il serait intéressant d'utiliser d'autres marqueurs, tels que Iba1 ou S100β, pour attester d'une inflammation. D'ailleurs, les processus inflammatoires pourraient être liés à l'initiation des synucléinopathies (Lema Tome *et al.*, 2013).

Comme évoqué précédemment, les mécanismes de toxicité du paraquat par rapport à l'α-syn sont loin d'être complétement compris. Ce pesticide est considéré comme un pesticide de référence dans la recherche sur la MP car il est montré que celui-ci reproduit une pathologie semblable à ce qui est vu chez les patients atteints de MP, comme la perte de neurones dopaminergiques ou la modulation de l'expression et de l'agrégation de l'α-syn, suite à l'injection intrapéritonéale de ce composé dans différents modèles murins (Fahim et

al., 2013; Manning-Bog et al., 2002). Lors de notre étude histologique, nous avons tenté d'étudier si l'exposition alimentaire au paraquat induit une perte de neurones dopaminergiques au niveau de la SN *pars compacta*, résultat présenté dans une communication affichée au XIème congrès dans la société des neurosciences. Cependant notre étude comportait une limite expérimentale forte : nous avons étudié une seule coupe de SNpc alors qu'une analyse rigoureuse de cette zone cérébrale implique l'étude sériée de plusieurs coupes recouvrant la totalité de sa longueur. Ce type d'analyse, appelées stéréologique, n'aurait pas pu être mis en place dans notre étude à cause du choix de recoupe macroscopique des cerveaux. Dans notre protocole de routine, les cerveaux des souris sont tranchés en 5 parties puis disposés de façon à pouvoir analyser 5 zones cérébrales du même cerveau par lame, empêchant ainsi une analyse stéréologique.

Le volet biochimique de notre analyse avait pour but premier de détecter et de quantifier la forme phosphorylée S129 de l'α-syn par une technique telle que l'ELISA ou le Western Blot. En utilisant le format d'ELISA le plus sensible que nous ayons mis au point pour la détection de cette forme phosphorylée de la protéine dans le cerveau (Sargent *et al.*, 2017), nous n'avons pas été en mesure de détecter cette protéine dans le SNE. Le format d'ELISA que nous avons utilisé convient parfaitement pour la détection de cette α-syn dans le cerveau. Ce format d'ELISA « sandwich » utilise l'anticorps Syn303 comme anticorps de capture, un anticorps reconnaissant l'α-syn totale. L'anticorps de détection est l'anticorps ab59264, reconnaissant la forme phosphorylée en sérine 129 de la protéine α-syn. Sur des échantillons de souris TgM83 âgées et symptomatiques, exprimant donc l'α-syn pathologique dans l'intestin et dans le cerveau, nous n'avons pas été en mesure de détecter cette forme pathologique de la protéine dans l'intestin alors qu'elle est détectable dans le cerveau. Les raisons de cet échec n'ont, à ce jour, pas été élucidées. Il est à noter que dans notre analyse histologique nous utilisons deux anticorps différents pour le cerveau en l'intestin. Dans la figure supplémentaire 2 de l'article publié dans JNEN, nous présentons nos résultats obtenus concernant les différences de détection entre plusieurs anticorps. Dans le cerveau, la forme phosphorylée S129 de l'α-syn est détectée par les trois anticorps anti protéine phosphorylée que nous disposons et dans l'intestin, seul l'anticorps ab51253 est capable de détecter la protéine phosphorylée dans les plexus myentériques. Forts de cette étude, nous avons donc tenté d'utiliser l'anticorps ab51253 dans notre format d'ELISA,

sachant que cet anticorps est le seul, dans nos expérimentations, capable de détecter l'α-syn S129 entérique. Pourtant, les résultats de ces tests ELISA sur des échantillons de souris TgM83 âgées ont encore une fois été infructueux. Ces résultats pourraient sous-entendre des différences structurales entre les formes cérébrales et entériques de l'α-syn, indiquées par le fait que l'α-syn entérique n'est détectée que par l'anticorps ab51253 de notre panel d'anticorps dirigés contre l'α-syn phosphorylée.

Théories d'initiation de la maladie de Parkinson

Les théories d'initiation de la MP sont diverses et chacune a ses avantages et ses inconvénients. Nos résultats montrent que l'ingestion d'une substance neurotoxique induit des effets incontestables sur le système nerveux présent dans l'intestin, mais aussi sur le cerveau.

Récemment, la validité et l'utilité prédictive de la classification de Braak ont été mises en doute par deux arguments notables. Le premier est que l'étendue de la synucléinopathie décrite par la classification de Braak ne correspond pas à la gravité clinique de la maladie, le deuxième est que des lésions de Lewy peuvent aussi être présentes chez des individus en bonne santé pourtant classé dans le stade 4 (ou plus) de la classification de Braak (Parkkinen *et al.*, 2005). Aussi, dans la DCL, les atteintes corticales se manifestent très tôt au cours de la maladie (Jellinger, 2012). Ainsi, de nouvelles hypothèses concernant l'étiopathogénie de la MP ont été formulées. La théorie du « seuil », présentée au début de l'année 2017 par Engelender et collègues (Engelender et Isacson, 2017), suggère l'existence d'un seuil fonctionnel dans l'apparition des symptômes de la MP. Ce seuil serait plus faible pour l'apparition de symptômes périphériques et autonomes précoce avant l'apparition des symptômes moteurs classiques de la maladie de Parkinson. Ceci s'expliquerait par les mécanismes de compensation fonctionnelle plus aboutis présents dans les systèmes moteurs dopaminergiques de la substance noire.

Comment nos résultats se situent-ils par rapport aux théories d'initiation de la MP ?

Nos deux études, histologiques et biochimiques, montrent les effets délétères du paraquat sur l'intestin. La théorie de Braak décrit une atteinte entérique précoce et la

théorie du seuil décrit une atteinte simultanée du SNE et du SNC. Nous montrons une atteinte précoce de l'intestin par notre étude immunohistochimique, et nous montrons l'induction d'une augmentation des niveaux d'α-syn suite à l'exposition orale au paraquat dans notre étude biochimique. Notre étude biochimique se rapprocherait plus de la théorie du seuil dans le sens où nous montrons l'augmentation simultanée entérique et cérébrale de l'α-syn, sous-tendant des atteintes parallèles de ces deux compartiments nerveux lors de l'exposition à un stress xénobiotique.

Plusieurs limites s'appliquent à nos recherches concernant l'étude de l'initiation des synucléinopathies. Le modèle transgénique que nous utilisons développe spontanément une pathologie parkinsonienne après 8 mois d'âge et présente une expression d'α-syn pathologique simultanément dans le SNE et SNC. Par analogie ce modèle s'apparenterait plus à une forme familiale de la MP, particulièrement éloigné des cas idiopathiques de la MP. Ainsi le modèle TgM83 pourrait ne pas être un modèle de choix pour étudier les théories d'initiation des cas idiopathiques de la MP.

La seconde critique que nous pourrions formuler à l'encontre de nos expérimentations concerne la voie d'exposition orale au paraquat. Aux doses considérées, nous montrons que le paraquat est circulant et qu'il peut avoir un effet délétère directement sur le cerveau. Dans le but d'étudier la propagation d'une synucléinopathie depuis l'intestin vers le cerveau, par l'intermédiaire du nerf vague, notre mode d'exposition ne nous permet pas de mener ce type d'études avec le type de pesticide utilisé, soluble et systémique.

Ainsi, nos résultats ne nous permettent pas de valider ou d'invalider une hypothèse d'initiation de la MP, cependant nous montrons que le système nerveux entérique peut jouer un rôle important en réponse à l'exposition orale à un pesticide.

Mise au point d'un modèle d'exposition à des pesticides

L'association entre l'exposition de souris par voie orale au paraquat et le test ELISA adapté de l'article publié par Emmanouillidou et collègues (Emmanouilidou *et al.*, 2011) mis en place dans ces travaux, servent à comparer les quantités d'α-syn totale dans les

échantillons de cerveau ou d'intestin. Dans le deuxième article publié dans notre étude, ce test a montré son efficacité dans la détection les modulations des niveaux d'α-syn dans les échantillons de souris exposées au paraquat.

Dans notre étude, l'exposition au paraquat par voie orale à la dose de 10 mg/kg induit une augmentation de 30 à 50% des niveaux cellulaires d'α-syn dans les différents segments étudiés, particulièrement, l'augmentation est forte dans le cortex des souris exposées. Ceci pourrait être mis en relation avec les phases les plus précoces de la MP, ou d'autres synucléinopathies, où l'augmentation des niveaux d'α-syn aurait un lien avec l'apparition d'inclusions de Lewy (Maries *et al.*, 2003).

D'autres pesticides ou substances chimiques pourraient être testés à faible dose dans les modèles C57Bl/6 et TgM83 afin d'étudier leur potentiel lien avec l'initiation de la MP. Ainsi, nous proposons ici un modèle d'évaluation de l'impact de substances chimiques dans l'apparition de la MP, basé sur une exposition par voie orale à faible dose.

Le modèle d'évaluation proposé ici pourrait utiliser un autre pesticide soluble administré par l'eau de boisson, ou alors un pesticide insoluble couplé à une administration soit par aliments additionnés de la substance d'intérêt, soit par gavage intragastrique dans une matrice gélifiée. Une fois les souris TgM83 ou C57Bl/6 exposées pendant un période courte, allant de 6 à 9 semaines, les cerveaux et intestin de celle-ci seraient collectés et analysés par le test ELISA sandwich détaillé dans l'article soumis au journal Neurotoxicology. Ce test ELISA comporte une première étape de capture de l'α-syn par l'anticorps monoclonal Clone 42, reconnaissant l'α-syn dite « normale » et l'α-syn phosphorylée dite « pathologique », la deuxième étape comporte la révélation de cette capture par l'anticorps anti α-syn C20R. Ce format d'anticorps permet donc de quantifier les quantités d'α-syn dans un échantillon cérébral ou intestinal relativement à un contrôle.

Même si la dose administrée dans nos études correspond à une dose relativement faible pour les modèles animaux, pour l'homme, cela est bien au-dessus des valeurs limites d'exposition. De la population générale, pour rappel la concentration maximale en pesticides dans les eaux de distribution est de 0,5 µg/L. Par contre, il est à noter que, dans le rapport sur l'exposition professionnelle aux pesticides publié en juillet 2016 par l'ANSES, les

opérateurs de pesticides pourraient être exposés à des doses cutanées allant de 6 mg/kg per capita/j à 24 mg/kg p.c./j, ces doses cutanées ne reflètent pas l'exposition orale, mais les quantités citées dans ce rapport sont bien plus hautes que l'exposition de la population générale. Ainsi l'exposition professionnelle pourrait mener les opérateurs à des expositions à des doses proches de celles utilisées dans notre étude.

Ainsi l'exposition de différentes lignées murines associées à au test ELISA décrit dans nos expérimentations pourrait être utile dans l'évaluation toxicologique de substances potentiellement liées aux synucléinopathies.

Perspectives

Pour aller plus loin dans notre étude, plusieurs expérimentations complémentaires sont à envisager afin de mieux comprendre l'implication que pourrait avoir le SNE suite à l'exposition orale au paraquat, ou à d'autres pesticides.

Le premier élément important serait d'étudier et de quantifier s'il se produit une bioaccumulation du paraquat dans les compartiments nerveux intestinaux, pour compléter la compréhension des effets de ce pesticide dans le SNE. Cette étude serait calquée sur l'article présenté par Prasad et collègues (Prasad *et al.*, 2009), où l'accumulation dose dépendante du paraquat dans le cerveau est montrée. Cette quantification des niveaux de paraquat dans l'intestin a été envisagée en 2015 avec un partenaire local (Rovaltain) ; cependant le coût important de cette expérimentation ne nous a pas permis de la réaliser.

Nous montrons que le paraquat peut moduler l'expression de l'α-syn et de la GFAP dans nos études. Cependant la modulation de ces protéines seules ne permet pas de conclure quant à l'initiation d'une synucléinopathie. Une étude plus large des effets du paraquat dans l'intestin et dans le cerveau pourrait être menée en regardant un plus grand nombre de protéines. Ceci pourrait se faire en conservant la même méthodologie que nous avons utilisée, c'est-à-dire en mettant en place un test biochimique permettant de quantifier la nouvelle protéine d'intérêt, ces protéines d'intérêt pourraient être des marqueurs de stress oxydatif, des marqueurs d'inflammation ou des marqueurs de nitration par exemple. L'autre méthode alternative et plus onéreuse serait de mener une étude transcriptomique. Dans une étude transcriptomique, plus d'un millier de protéines pourraient être étudiées simultanément, ainsi, en étudiant une souris exposée et une souris contrôle, nous pourrions voir plus finement les modifications induites par l'exposition orale au paraquat, dans différents compartiments nerveux. Ceci permettrait alors de dégager de nouvelles protéines d'intérêt dans l'étude de biomarqueurs précoces associés à l'exposition à des pesticides.

Beaucoup d'études font le constat que l'exposition de la population générale se fait à très faible dose mais à un nombre important de pesticides, par exemple de 10 à 20 substances par l'eau de ville et l'alimentation en France. L'évaluation du risque sanitaire par rapport à ces résidus de pesticides pourrait être menée en étudiant justement ces pesticides

retrouvés à l'état de traces sur les aliments ou dans l'eau de distribution. Ainsi des études « cocktails » sur ces substances, c'est-à-dire exposer des souris à plusieurs substances simultanément, pourraient permettre de mieux étudier et évaluer l'impact de la contamination résiduelle de la population générale en France à ces substances. Il est d'ailleurs montré que l'exposition de souris à deux substances ou plus peut engendrer une synergie, menant à une toxicité plus forte (Su et Niu, 2015).

L'« effet cocktail » de l'exposition de la population générale à des substances chimiques variées est une question majeure de santé publique.

Conclusion

Les résultats acquis pendant ces trois années de thèse permettent de mieux comprendre l'impact de l'exposition par voie orale au paraquat au niveau du système nerveux entérique dans deux modèles murins transgéniques et sauvages. Aussi, nous proposons un modèle d'évaluation de l'impact d'un pesticide sur l'α-syn en lien avec l'initiation de la maladie de Parkinson.

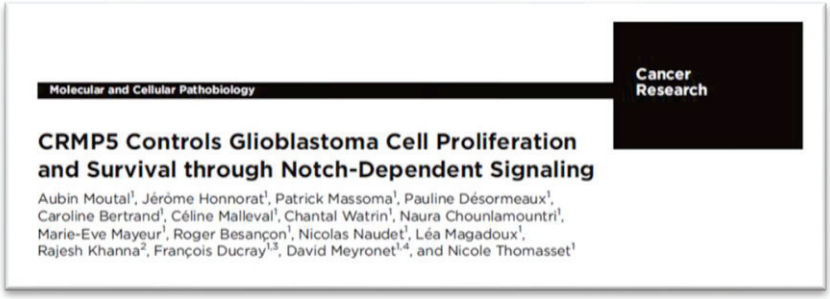
Notre première étude démontre que l'exposition au paraquat par voie orale est capable d'accélérer une réponse neurotoxique chez les souris TgM83, comme le montre l'expression précoce et forte de l'α-syn pathologique associé à l'induction d'une gliose, cependant cette accélération n'est pas identifiée dans le cerveau à la durée d'exposition choisie. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les neurones entériques sont plus directement exposés aux xénobiotiques environnementaux ingérés. Nous montrons aussi dans cette première étude que la lignée transgénique TgM83 peut être un modèle sensible face à des facteurs de stress environnementaux tels que le paraquat, et est pertinente pour l'étude de la façon dont l'ingestion orale d'agents neurotoxiques peut initier les processus neuropathologiques impliquant l'α-syn. Par ces résultats nous montrons aussi que ce modèle pourrait être un outil précieux dans l'évaluation d'autres autres substances chimiques suspectées d'être liées aux synucléinopathies.

Notre deuxième étude donne de nouvelles perspectives sur l'effet de l'exposition orale et à faible dose au paraquat sur les taux d'α-syn dans les mêmes lignées murines. Le paraquat induit une réponse générale d'augmentation de l'α-syn dans les deux lignées étudiées, tant dans le cerveau que dans le compartiment nerveux présent dans l'intestin. En outre, nous fournissons ici la base d'un modèle expérimental utile et facile à mettre en place pour d'autres études des effets des pesticides en relation avec la protéine α-syn.

Les résultats acquis lors de ces travaux de thèse ne permettent pas de confirmer une théorie d'initiation pour les synucléinopathies, cependant ils mettent en avant le rôle important du SNE présent dans l'intestin en réponse à l'exposition orale à un pesticide.

Liste des publications acceptées pendant le doctorat

Moutal, A., Honnorat, J., Massoma, P., Desormeaux, P., Bertrand, C., Malleval, C., Watrin, C., Chounlamountri, N., Mayeur, M.E., Besancon, R., **Naudet, N.**, Magadoux, L., Khanna, R., Ducray, F., Meyronet, D., Thomasset, N., 2015. CRMP5 Controls Glioblastoma Cell Proliferation and Survival through Notch-Dependent Signaling. Cancer Res 75, 3519-3528.

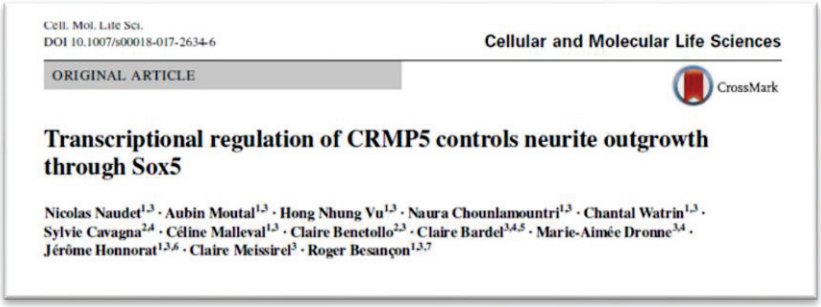

Molecular and Cellular Pathobiology

Cancer Research

CRMP5 Controls Glioblastoma Cell Proliferation and Survival through Notch-Dependent Signaling

Aubin Moutal[1], Jérôme Honnorat[1], Patrick Massoma[1], Pauline Désormeaux[1], Caroline Bertrand[1], Céline Malleval[1], Chantal Watrin[1], Naura Chounlamountri[1], Marie-Eve Mayeur[1], Roger Besançon[1], Nicolas Naudet[1], Léa Magadoux[1], Rajesh Khanna[2], François Ducray[1,3], David Meyronet[1,4], and Nicole Thomasset[1]

Naudet, N., Moutal, A., Vu, H.N., Chounlamountri, N., Watrin, C., Cavagna, S., Malleval, C., Benetollo, C., Bardel, C., Dronne, M.A., Honnorat, J., Meissirel, C., Besancon, R., 2017b. Transcriptional regulation of CRMP5 controls neurite outgrowth through Sox5. Cell Mol Life Sci.


Cell. Mol. Life Sci.
DOI 10.1007/s00018-017-2634-6

Cellular and Molecular Life Sciences

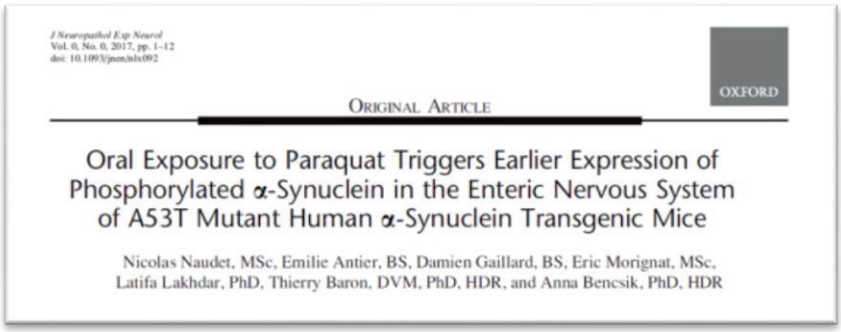
ORIGINAL ARTICLE

CrossMark

Transcriptional regulation of CRMP5 controls neurite outgrowth through Sox5

Nicolas Naudet[1,3] · Aubin Moutal[1,3] · Hong Nhung Vu[1,3] · Naura Chounlamountri[1,3] · Chantal Watrin[1,3] · Sylvie Cavagna[2,4] · Céline Malleval[1,3] · Claire Benetollo[2,3] · Claire Bardel[3,4,5] · Marie-Aimée Dronne[3,4] · Jérôme Honnorat[1,3,6] · Claire Meissirel[3] · Roger Besançon[1,3,7]

Naudet, N., Antier, E., Gaillard, D., Morignat, E., Lakhdar, L., Baron, T., Bencsik, A., 2017a. Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α-Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α-Synuclein Transgenic Mice. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, nlx092-nlx092.


J Neuropathol Exp Neurol
Vol. 0, No. 0, 2017, pp. 1–12
doi: 10.1093/jnen/nlx092

OXFORD

ORIGINAL ARTICLE

Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α-Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α-Synuclein Transgenic Mice

Nicolas Naudet, MSc, Emilie Antier, BS, Damien Gaillard, BS, Eric Morignat, MSc, Latifa Lakhdar, PhD, Thierry Baron, DVM, PhD, HDR, and Anna Bencsik, PhD, HDR

Bibliographie

Aldecoa, I., Navarro-Otano, J., Stefanova, N., Sprenger, F.S., Seppi, K., Poewe, W., Cuatrecasas, M., Valldeoriola, F., Gelpi, E., Tolosa, E., 2015. Alpha-synuclein immunoreactivity patterns in the enteric nervous system. Neuroscience letters 602, 145-149.

Amiel, J., Sproat-Emison, E., Garcia-Barcelo, M., Lantieri, F., Burzynski, G., Borrego, S., Pelet, A., Arnold, S., Miao, X., Griseri, P., Brooks, A.S., Antinolo, G., de Pontual, L., Clement-Ziza, M., Munnich, A., Kashuk, C., West, K., Wong, K.K., Lyonnet, S., Chakravarti, A., Tam, P.K., Ceccherini, I., Hofstra, R.M., Fernandez, R., Hirschsprung Disease, C., 2008. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. J Med Genet 45, 1-14.

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 Stoessl, A., Farrer, M.J., 2013. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 28, 811-813.

Arawaka, S., Saito, Y., Murayama, S., Mori, H., 1998. Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 is immunoreactive for alpha-synuclein. Neurology 51, 887-889.

Armitage, R., Roffwarg, H.P., 1992. Distribution of period-analyzed delta activity during sleep. Sleep 15, 556-561.

Athanassiadou, A., Voutsinas, G., Psiouri, L., Leroy, E., Polymeropoulos, M.H., Ilias, A., Maniatis, G.M., Papapetropoulos, T., 1999. Genetic analysis of families with Parkinson disease that carry the Ala53Thr mutation in the gene encoding alpha-synuclein. Am J Hum Genet 65, 555-558.

Attems, J., Jellinger, K.A., 2008. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease. Neuropathology and applied neurobiology 34, 466-467.

Azeredo da Silveira, S., Schneider, B.L., Cifuentes-Diaz, C., Sage, D., Abbas-Terki, T., Iwatsubo, T., Unser, M., Aebischer, P., 2009. Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of alpha-synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease. Human molecular genetics 18, 872-887.

Azevedo, F.A., Carvalho, L.R., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E., Leite, R.E., Jacob Filho, W., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. The Journal of comparative neurology 513, 532-541.

Baba, Y., Markopoulou, K., Putzke, J.D., Whaley, N.R., Farrer, M.J., Wszolek, Z.K., Uitti, R.J., 2006. Phenotypic commonalities in familial and sporadic Parkinson disease. Archives of neurology 63, 579-583.

Bachmanov, A.A., Reed, D.R., Beauchamp, G.K., Tordoff, M.G., 2002. Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. Behav Genet 32, 435-443.

Baltazar, M.T., Dinis-Oliveira, R.J., de Lourdes Bastos, M., Tsatsakis, A.M., Duarte, J.A., Carvalho, F., 2014. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach. Toxicology letters 230, 85-103.

Barbour, R., Kling, K., Anderson, J.P., Banducci, K., Cole, T., Diep, L., Fox, M., Goldstein, J.M., Soriano, F., Seubert, P., Chilcote, T.J., 2008. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. Neuro-degenerative diseases 5, 55-59.

Barnat, S., Boisset, M., Casse, F., Catteau, M., Lecerf, J.M., Veschambre, D., Periquet, A., 2010. Pesticide residues intake of French adults under increased consumption of fresh fruits and vegetables--a theoretical study. J Environ Sci Health B 45, 102-107.

Barrett, P.J., Timothy Greenamyre, J., 2015. Post-translational modification of alpha-synuclein in Parkinson's disease. Brain Res 1628, 247-253.

Bartels, T., Choi, J.G., Selkoe, D.J., 2011. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. Nature 477, 107-110.

Barter, J.W., Castro, S., Sukharnikova, T., Rossi, M.A., Yin, H.H., 2014. The role of the substantia nigra in posture control. The European journal of neuroscience 39, 1465-1473.

Beach, T.G., Adler, C.H., Sue, L.I., Vedders, L., Lue, L., White Iii, C.L., Akiyama, H., Caviness, J.N., Shill, H.A., Sabbagh, M.N., Walker, D.G., 2010a. Multi-organ distribution of phosphorylated α-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. Acta Neuropathologica 119, 689-702.

Beach, T.G., Adler, C.H., Sue, L.I., Vedders, L., Lue, L., White Iii, C.L., Akiyama, H., Caviness, J.N., Shill, H.A., Sabbagh, M.N., Walker, D.G., Arizona Parkinson's Disease, C., 2010b. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. Acta Neuropathol 119, 689-702.

Beach, T.G., Corbille, A.G., Letournel, F., Kordower, J.H., Kremer, T., Munoz, D.G., Intorcia, A., Hentz, J., Adler, C.H., Sue, L.I., Walker, J., Serrano, G., Derkinderen, P., 2016. Multicenter Assessment of Immunohistochemical Methods for Pathological Alpha-Synuclein in Sigmoid Colon of Autopsied Parkinson's Disease and Control Subjects. Journal of Parkinson's disease 6, 761-770.

Bechaux, C., Zetlaoui, M., Tressou, J., Leblanc, J.C., Heraud, F., Crepet, A., 2013. Identification of pesticide mixtures and connection between combined exposure and diet. Food Chem Toxicol 59, 191-198.

Bellucci, A., Navarria, L., Zaltieri, M., Falarti, E., Bodei, S., Sigala, S., Battistin, L., Spillantini, M., Missale, C., Spano, P., 2011. Induction of the unfolded protein response by alpha-synuclein in experimental models of Parkinson's disease. Journal of neurochemistry 116, 588-605.

Belsey, N.A., Cordery, S.F., Bunge, A.L., Guy, R.H., 2011. Assessment of dermal exposure to pesticide residues during re-entry. Environ Sci Technol 45, 4609-4615.

Bencsik, A., Muselli, L., Leboidre, M., Lakhdar, L., Baron, T., 2014. Early and persistent expression of phosphorylated alpha-synuclein in the enteric nervous system of A53T mutant human alpha-synuclein transgenic mice. J Neuropathol Exp Neurol 73, 1144-1151.

Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., 1998. The effect of l-3,4-dihydroxyphenylalanine (=DOPA) on akinesia in parkinsonism. Parkinsonism & related disorders 4, 59-60.

Bisaglia, M., Trolio, A., Bellanda, M., Bergantino, E., Bubacco, L., Mammi, S., 2006. Structure and topology of the non-amyloid-beta component fragment of human alpha-synuclein bound to micelles: implications for the aggregation process. Protein science : a publication of the Protein Society 15, 1408-1416.

Blin, P., Dureau-Pournin, C., Foubert-Samier, A., Grolleau, A., Corbillon, E., Jove, J., Lassalle, R., Robinson, P., Poutignat, N., Droz-Perroteau, C., Moore, N., 2015. Parkinson's

disease incidence and prevalence assessment in France using the national healthcare insurance database. European journal of neurology 22, 464-471.
Bové, J., Prou, D., Perier, C., Przedborski, S., 2005. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. NeuroRx 2, 484-494.
Braak, H., de Vos, R.A., Bohl, J., Del Tredici, K., 2006. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. Neuroscience letters 396, 67-72.
Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., Braak, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiology of aging 24, 197-211.
Breckenridge, C.B., Sturgess, N.C., Butt, M., Wolf, J.C., Zadory, D., Beck, M., Mathews, J.M., Tisdel, M.O., Minnema, D., Travis, K.Z., Cook, A.R., Botham, P.A., Smith, L.L., 2013. Pharmacokinetic, neurochemical, stereological and neuropathological studies on the potential effects of paraquat in the substantia nigra pars compacta and striatum of male C57BL/6J mice. Neurotoxicology 37, 1-14.
Breydo, L., Wu, J.W., Uversky, V.N., 2012. Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease. Biochim Biophys Acta 1822, 261-285.
Brion, J.P., Couck, A.M., 1995. Cortical and brainstem-type Lewy bodies are immunoreactive for the cyclin-dependent kinase 5. The American journal of pathology 147, 1465-1476.
Brooks, D.J., 2009. Imaging amyloid in Parkinson's disease dementia and dementia with Lewy bodies with positron emission tomography. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 24 Suppl 2, S742-747.
Brundin, P., Li, J.Y., Holton, J.L., Lindvall, O., Revesz, T., 2008. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. Nature reviews. Neuroscience 9, 741-745.
Burke, R.E., Dauer, W.T., Vonsattel, J.P., 2008. A critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. Annals of neurology 64, 485-491.
Butler, B., Sambo, D., Khoshbouei, H., 2017. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. Journal of chemical neuroanatomy 83-84, 41-49.
Campdelacreu, J., 2014. Parkinson disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. Neurologia (Barcelona, Spain) 29, 541-549.
Caslake, R., Taylor, K., Scott, N., Gordon, J., Harris, C., Wilde, K., Murray, A., Counsell, C., 2013. Age-, gender-, and socioeconomic status-specific incidence of Parkinson's disease and parkinsonism in northeast Scotland: the PINE study. Parkinsonism & related disorders 19, 515-521.
Cersosimo, M.G., Raina, G.B., Pecci, C., Pellene, A., Calandra, C.R., Gutiérrez, C., Micheli, F.E., Benarroch, E.E., 2013. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. Journal of Neurology 260, 1332-1338.
Chartier-Harlin, M.C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., Destee, A., 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. Lancet (London, England) 364, 1167-1169.
Chavarria, C., Souza, J.M., 2013. Oxidation and nitration of alpha-synuclein and their implications in neurodegenerative diseases. Archives of biochemistry and biophysics 533, 25-32.

Chen, L., Feany, M.B., 2005. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease. Nature neuroscience 8, 657-663.
Chodobski, A., Zink, B.J., Szmydynger-Chodobska, J., 2011. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. Translational stroke research 2, 492-516.
Choi, W.S., Kruse, S.E., Palmiter, R.D., Xia, Z., 2008. Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 15136-15141.
Chorfa, A., Betemps, D., Morignat, E., Lazizzera, C., Hogeveen, K., Andrieu, T., Baron, T., 2013. Specific pesticide-dependent increases in alpha-synuclein levels in human neuroblastoma (SH-SY5Y) and melanoma (SK-MEL-2) cell lines. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 133, 289-297.
Chung, E.J., Babulal, G.M., Monsell, S.E., Cairns, N.J., Roe, C.M., Morris, J.C., 2015. Clinical Features of Alzheimer Disease With and Without Lewy Bodies. JAMA neurology 72, 789-796.
Chung, S.J., Kim, J., Lee, H.J., Ryu, H.S., Kim, K., Lee, J.H., Jung, K.W., Kim, M.J., Kim, M.J., Kim, Y.J., Yun, S.C., Lee, J.Y., Hong, S.M., Myung, S.J., 2016. Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: Limited role as a biomarker. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 31, 241-249.
Clairembault, T., Kamphuis, W., Leclair-Visonneau, L., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., Neunlist, M., Hol, E.M., Derkinderen, P., 2014. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. Journal of neurochemistry 130, 805-815.
Cocheme, H.M., Murphy, M.P., 2008. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. The Journal of biological chemistry 283, 1786-1798.
Coelho-Cerqueira, E., Carmo-Goncalves, P., Pinheiro, A.S., Cortines, J., Follmer, C., 2013. alpha-Synuclein as an intrinsically disordered monomer--fact or artefact? The FEBS journal 280, 4915-4927.
Cole, N.B., Murphy, D.D., Grider, T., Rueter, S., Brasaemle, D., Nussbaum, R.L., 2002. Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. The Journal of biological chemistry 277, 6344-6352.
Conway, K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C., Ding, T.T., Harper, J.D., Williamson, R.E., Lansbury, P.T., Jr., 2000. Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants. Annals of the New York Academy of Sciences 920, 42-45.
Cookson, M.R., 2009. alpha-Synuclein and neuronal cell death. Mol Neurodegener 4, 9.
Corasaniti, M.T., Defilippo, R., Rodino, P., Nappi, G., Nistico, G., 1991. Evidence that paraquat is able to cross the blood-brain barrier to a different extent in rats of various age. Functional neurology 6, 385-391.
Corasaniti, M.T., Strongoli, M.C., Rotiroti, D., Bagetta, G., Nistico, G., 1998. Paraquat: a useful tool for the in vivo study of mechanisms of neuronal cell death. Pharmacol Toxicol 83, 1-7.
Corbille, A.G., Coron, E., Neunlist, M., Derkinderen, P., Lebouvier, T., 2014. Appraisal of the dopaminergic and noradrenergic innervation of the submucosal plexus in PD. Journal of Parkinson's disease 4, 571-576.
Costa, M., Brookes, S.J.H., Hennig, G.W., 2000. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. Gut 47, iv15.
Costa, M., Wattchow, D., Brookes, S., 2002. Neuronal control in gastrointestinal disease. Eur J Surg Suppl, 39-46.

Cox, D., Selig, E., Griffin, M.D., Carver, J.A., Ecroyd, H., 2016. Small Heat-shock Proteins Prevent alpha-Synuclein Aggregation via Transient Interactions and Their Efficacy Is Affected by the Rate of Aggregation. The Journal of biological chemistry 291, 22618-22629.

Cruz-Haces, M., Tang, J., Acosta, G., Fernandez, J., Shi, R., 2017. Pathological correlations between traumatic brain injury and chronic neurodegenerative diseases. Translational Neurodegeneration 6, 20.

Dedmon, M.M., Lindorff-Larsen, K., Christodoulou, J., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., 2005. Mapping long-range interactions in alpha-synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. Journal of the American Chemical Society 127, 476-477.

DeGray, J.A., Rao, D.N., Mason, R.P., 1991. Reduction of paraquat and related bipyridylium compounds to free radical metabolites by rat hepatocytes. Archives of biochemistry and biophysics 289, 145-152.

Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., Singleton, A., Olanow, C.W., Merchant, K.M., Bezard, E., Petsko, G.A., Meissner, W.G., 2015. Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. The Lancet. Neurology 14, 855-866.

Derkinderen, P., Rouaud, T., Lebouvier, T., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., De Giorgio, R., 2011. Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. Neurology 77, 1761-1767.

Derkinderen, P., Shannon, K.M., Brundin, P., 2014. Gut feelings about smoking and coffee in Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 29, 976-979.

Dettmer, U., Newman, A.J., von Saucken, V.E., Bartels, T., Selkoe, D., 2015. KTKEGV repeat motifs are key mediators of normal alpha-synuclein tetramerization: Their mutation causes excess monomers and neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 112, 9596-9601.

Dickson, D.W., Feany, M.B., Yen, S.H., Mattiace, L.A., Davies, P., 1996. Cytoskeletal pathology in non-Alzheimer degenerative dementia: new lesions in diffuse Lewy body disease, Pick's disease, and corticobasal degeneration. Journal of neural transmission. Supplementum 47, 31-46.

Dikiy, I., Eliezer, D., 2012. Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes. Biochim Biophys Acta 1818, 1013-1018.

Dunning, C.J.R., George, S., Brundin, P., 2013. What’s to like about the prion-like hypothesis for the spreading of aggregated α-synuclein in Parkinson disease? Prion 7, 92-97.

Edwards, L.L., Pfeiffer, R.F., Quigley, E.M., Hofman, R., Balluff, M., 1991. Gastrointestinal symptoms in Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 6, 151-156.

El-Agnaf, O.M., Jakes, R., Curran, M.D., Middleton, D., Ingenito, R., Bianchi, E., Pessi, A., Neill, D., Wallace, A., 1998. Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. FEBS letters 440, 71-75.

Elbaz, A., Clavel, J., Rathouz, P.J., Moisan, F., Galanaud, J.P., Delemotte, B., Alperovitch, A., Tzourio, C., 2009. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. Annals of neurology 66, 494-504.

Emmanouilidou, E., Elenis, D., Papasilekas, T., Stranjalis, G., Gerozissis, K., Ioannou, P.C., Vekrellis, K., 2011. Assessment of alpha-synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma. PLoS One 6, e22225.

Engelender, S., Isacson, O., 2017. The Threshold Theory for Parkinson's Disease. Trends in neurosciences 40, 4-14.

Fernagut, P.O., Hutson, C.B., Fleming, S.M., Tetreaut, N.A., Salcedo, J., Masliah, E., Chesselet, M.F., 2007. Behavioral and histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: effects of alpha-synuclein over-expression. Synapse (New York, N.Y.) 61, 991-1001.

Firestone, J.A., Smith-Weller, T., Franklin, G., Swanson, P., Longstreth, W.T., Jr., Checkoway, H., 2005. Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study. Archives of neurology 62, 91-95.

Fiske, M., Valtierra, S., Solvang, K., Zorniak, M., White, M., Herrera, S., Konnikova, A., Brezinsky, R., Debburman, S., 2011. Contribution of Alanine-76 and Serine Phosphorylation in alpha-Synuclein Membrane Association and Aggregation in Yeasts. Parkinson's disease 2011, 392180.

Floor, E., Wetzel, M.G., 1998. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. Journal of neurochemistry 70, 268-275.

Ford, B., 2010. Pain in Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 25 Suppl 1, S98-103.

Friedman, J.H., 2013. Parkinson disease psychosis: Update. Behavioural neurology 27, 469-477.

Fu, H., Subramanian, R.R., Masters, S.C., 2000. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. Annual review of pharmacology and toxicology 40, 617-647.

Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., Iwatsubo, T., 2002. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. Nat Cell Biol 4, 160-164.

Furness, J.B., 2006. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. Autonomic neuroscience : basic & clinical 130, 1-5.

Galvin, J.E., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2001. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. Archives of neurology 58, 186-190.

Gasser, T., 2009. Mendelian forms of Parkinson's disease. Biochim Biophys Acta 1792, 587-596.

Gavett, B.E., Stern, R.A., Cantu, R.C., Nowinski, C.J., McKee, A.C., 2010. Mild traumatic brain injury: a risk factor for neurodegeneration. Alzheimer's Research & Therapy 2, 18-18.

George, J.M., 2002. The synucleins. Genome Biology 3, reviews3002.3001-reviews3002.3006.

Giannakis, E., Pacifico, J., Smith, D.P., Hung, L.W., Masters, C.L., Cappai, R., Wade, J.D., Barnham, K.J., 2008. Dimeric structures of alpha-synuclein bind preferentially to lipid membranes. Biochim Biophys Acta 1778, 1112-1119.

Giasson, B.I., Uryu, K., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 1999. Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. The Journal of biological chemistry 274, 7619-7622.

Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., 2017. The Synucleinopathies: Twenty Years On. Journal of Parkinson's disease 7, S53-s71.

Goetze, O., Nikodem, A.B., Wiezcorek, J., Banasch, M., Przuntek, H., Mueller, T., Schmidt, W.E., Woitalla, D., 2006. Predictors of gastric emptying in Parkinson's disease. Neurogastroenterol Motil 18, 369-375.

Goldman, S.M., Tanner, C.M., Oakes, D., Bhudhikanok, G.S., Gupta, A., Langston, J.W., 2006. Head injury and Parkinson's disease risk in twins. Annals of neurology 60, 65-72.

Gonzalez-Horta, A., 2015. The Interaction of Alpha-synuclein with Membranes and its Implication in Parkinson's Disease: A Literature Review. Natural product communications 10, 1775-1778.

Grabie, V., Scemama, J.L., Robertson, J.B., Seidel, E.R., 1993. Paraquat uptake in the cultured gastrointestinal epithelial cell line, IEC-6. Toxicol Appl Pharmacol 122, 95-100.

Greene, J.G., 2014. Causes and consequences of degeneration of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in Parkinson's disease. Antioxidants & redox signaling 21, 649-667.

Greten-Harrison, B., Polydoro, M., Morimoto-Tomita, M., Diao, L., Williams, A.M., Nie, E.H., Makani, S., Tian, N., Castillo, P.E., Buchman, V.L., Chandra, S.S., 2010. alphabetagamma-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 19573-19578.

Gulbransen, B.D., Sharkey, K.A., 2012. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 9, 625-632.

Haehner, A., Hummel, T., Hummel, C., Sommer, U., Junghanns, S., Reichmann, H., 2007. Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 22, 839-842.

Hallett, M., 2012. Parkinson's disease tremor: pathophysiology. Parkinsonism & related disorders 18 Suppl 1, S85-86.

Hansen, C., Angot, E., Bergstrom, A.L., Steiner, J.A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T.F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., Li, J.Y., Brundin, P., 2011. alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. The Journal of clinical investigation 121, 715-725.

Hara, S., Arawaka, S., Sato, H., Machiya, Y., Cui, C., Sasaki, A., Koyama, S., Kato, T., 2013. Serine 129 phosphorylation of membrane-associated alpha-synuclein modulates dopamine transporter function in a G protein-coupled receptor kinase-dependent manner. Mol Biol Cell 24, 1649-1660, S1641-1643.

Hawkes, C.H., Del Tredici, K., Braak, H., 2007. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. Neuropathology and applied neurobiology 33, 599-614.

Hawkes, C.H., Shephard, B.C., Daniel, S.E., 1997. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 62, 436-446.

Heidebrink, J.L., 2002. Is dementia with Lewy bodies the second most common cause of dementia? Journal of geriatric psychiatry and neurology 15, 182-187.

Hemmerle, A.M., Herman, J.P., Seroogy, K.B., 2012. Stress, depression and Parkinson's disease. Experimental neurology 233, 79-86.

Hernandez-Romero, M.C., Delgado-Cortes, M.J., Sarmiento, M., de Pablos, R.M., Espinosa-Oliva, A.M., Arguelles, S., Bandez, M.J., Villaran, R.F., Maurino, R., Santiago, M., Venero, J.L., Herrera, A.J., Cano, J., Machado, A., 2012. Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. Neurotoxicology 33, 347-360.

Hill, W.D., Lee, V.M., Hurtig, H.I., Murray, J.M., Trojanowski, J.Q., 1991. Epitopes located in spatially separate domains of each neurofilament subunit are present in Parkinson's disease Lewy bodies. The Journal of comparative neurology 309, 150-160.
Hobson, D.E., 2003. Clinical manifestations of Parkinson's disease and parkinsonism. The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques 30 Suppl 1, S2-9.
Hobson, P., Meara, J., Ishihara-Paul, L., 2010. The estimated life expectancy in a community cohort of Parkinson's disease patients with and without dementia, compared with the UK population. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 81, 1093-1098.
Holmqvist, S., Chutna, O., Bousset, L., Aldrin-Kirk, P., Li, W., Bjorklund, T., Wang, Z.Y., Roybon, L., Melki, R., Li, J.Y., 2014. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. Acta Neuropathol 128, 805-820.
Hong, D.P., Fink, A.L., Uversky, V.N., 2009. Smoking and Parkinson's disease: does nicotine affect alpha-synuclein fibrillation? Biochim Biophys Acta 1794, 282-290.
Hong, D.P., Xiong, W., Chang, J.Y., Jiang, C., 2011. The role of the C-terminus of human alpha-synuclein: intra-disulfide bonds between the C-terminus and other regions stabilize non-fibrillar monomeric isomers. FEBS letters 585, 561-566.
Howell, M.J., Schenck, C.H., 2015. Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder and Neurodegenerative Disease. JAMA neurology 72, 707-712.
Hug, K., Roosli, M., Rapp, R., 2006. Magnetic field exposure and neurodegenerative diseases--recent epidemiological studies. Soz Praventivmed 51, 210-220.
Hughes, A.J., Daniel, S.E., Ben-Shlomo, Y., Lees, A.J., 2002. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. Brain : a journal of neurology 125, 861-870.
Hummel, T., Fliessbach, K., Abele, M., Okulla, T., Reden, J., Reichmann, H., Wüllner, U., Haehner, A., 2010. Olfactory fMRI in Patients with Parkinson's Disease. Frontiers in Integrative Neuroscience 4, 125.
Ingelsson, M., 2016. Alpha-Synuclein Oligomers—Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. Frontiers in Neuroscience 10.
Inglis, K.J., Chereau, D., Brigham, E.F., Chiou, S.S., Schobel, S., Frigon, N.L., Yu, M., Caccavello, R.J., Nelson, S., Motter, R., Wright, S., Chian, D., Santiago, P., Soriano, F., Ramos, C., Powell, K., Goldstein, J.M., Babcock, M., Yednock, T., Bard, F., Basi, G.S., Sham, H., Chilcote, T.J., McConlogue, L., Griswold-Prenner, I., Anderson, J.P., 2009. Polo-like kinase 2 (PLK2) phosphorylates alpha-synuclein at serine 129 in central nervous system. The Journal of biological chemistry 284, 2598-2602.
Jafari, S., Etminan, M., Aminzadeh, F., Samii, A., 2013. Head injury and risk of Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 28, 1222-1229.
Jakowec, M.W., Petzinger, G.M., 2004. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates. Comp Med 54, 497-513.
James, K.A., Hall, D.A., 2015. Groundwater pesticide levels and the association with Parkinson disease. International journal of toxicology 34, 266-273.
Jellinger, K.A., 2009. A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. Biochim Biophys Acta 1792, 730-740.

Jellinger, K.A., 2012. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 27, 8-30.
Ji, H., Liu, Y.E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., Joseph, B.K., Rosen, C., Shi, Y.E., 1997. Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. Cancer Res 57, 759-764.
Johansen, C., 2000. Exposure to electromagnetic fields and risk of central nervous system disease in utility workers. Epidemiology (Cambridge, Mass.) 11, 539-543.
Jost, W.H., 2013. Urological problems in Parkinson's disease: clinical aspects. Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996) 120, 587-591.
Kachroo, A., Irizarry, M.C., Schwarzschild, M.A., 2010. Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. Experimental neurology 223, 657-661.
Kalaitzakis, M.E., Graeber, M.B., Gentleman, S.M., Pearce, R.K., 2008. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of alpha-synuclein staging. Neuropathology and applied neurobiology 34, 284-295.
Kalia, L.V., Lang, A.E., 2015. Parkinson's disease. Lancet (London, England) 386, 896-912.
Kasanuki, K., Iseki, E., Fujishiro, H., Ando, S., Sugiyama, H., Kitazawa, M., Chiba, Y., Sato, K., Arai, H., 2015. Impaired heart rate variability in patients with dementia with Lewy bodies: Efficacy of electrocardiogram as a supporting diagnostic marker. Parkinsonism & related disorders 21, 749-754.
Kasten, M., Klein, C., 2013. The many faces of alpha-synuclein mutations. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 28, 697-701.
Kaye, J., Gage, H., Kimber, A., Storey, L., Trend, P., 2006. Excess burden of constipation in Parkinson's disease: a pilot study. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 21, 1270-1273.
Kempster, P.A., O'Sullivan, S.S., Holton, J.L., Revesz, T., Lees, A.J., 2010. Relationships between age and late progression of Parkinson's disease: a clinico-pathological study. Brain : a journal of neurology 133, 1755-1762.
Khoo, T.K., Yarnall, A.J., Duncan, G.W., Coleman, S., O'Brien, J.T., Brooks, D.J., Barker, R.A., Burn, D.J., 2013. The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. Neurology 80, 276-281.
Ki, C.S., Stavrou, E.F., Davanos, N., Lee, W.Y., Chung, E.J., Kim, J.Y., Athanassiadou, A., 2007. The Ala53Thr mutation in the alpha-synuclein gene in a Korean family with Parkinson disease. Clinical genetics 71, 471-473.
Kieburtz, K., Wunderle, K.B., 2013. Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 28, 8-13.
Kim, H.J., 2013. Alpha-Synuclein Expression in Patients with Parkinson's Disease: A Clinician's Perspective. Experimental neurobiology 22, 77-83.
Kim, W.S., Kagedal, K., Halliday, G.M., 2014. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. Alzheimers Res Ther 6, 73.
Kimmell, K., Pulusu, V.K., Bharucha, K.J., Ross, E.D., 2015. Postural instability in Parkinson Disease: to step or not to step. J Neurol Sci 357, 146-151.
Klein, C., Schlossmacher, M.G., 2006. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. Nat Clin Pract Neurol 2, 136-146.

Klos, K.J., Ahlskog, J.E., Josephs, K.A., Apaydin, H., Parisi, J.E., Boeve, B.F., DeLucia, M.W., Dickson, D.W., 2006. Alpha-synuclein pathology in the spinal cords of neurologically asymptomatic aged individuals. Neurology 66, 1100-1102.
Knudsen, K., Haase, A.M., Fedorova, T.D., Bekker, A.C., Ostergaard, K., Krogh, K., Borghammer, P., 2017. Gastrointestinal Transit Time in Parkinson's Disease Using a Magnetic Tracking System. Journal of Parkinson's disease 7, 471-479.
Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., Olanow, C.W., 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. Nature medicine 14, 504-506.
Kosaka, K., 2014. Lewy body disease and dementia with Lewy bodies. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences 90, 301-306.
Kupsky, W.J., Grimes, M.M., Sweeting, J., Bertsch, R., Cote, L.J., 1987. Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. Neurology 37, 1253-1255.
Kurz, A., Double, K.L., Lastres-Becker, I., Tozzi, A., Tantucci, M., Bockhart, V., Bonin, M., Garcia-Arencibia, M., Nuber, S., Schlaudraff, F., Liss, B., Fernandez-Ruiz, J., Gerlach, M., Wullner, U., Luddens, H., Calabresi, P., Auburger, G., Gispert, S., 2010. A53T-alpha-synuclein overexpression impairs dopamine signaling and striatal synaptic plasticity in old mice. PLoS One 5, e11464.
Lagoo, J., Pappas, T.N., Perez, A., 2014. A relic or still relevant: the narrowing role for vagotomy in the treatment of peptic ulcer disease. Am J Surg 207, 120-126.
Langer, J.C., 2013. Hirschsprung disease. Curr Opin Pediatr 25, 368-374.
Langston, J.W., 1987. MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease. European neurology 26 Suppl 1, 2-10.
Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., Irwin, I., 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science (New York, N.Y.) 219, 979-980.
Lashuel, H.A., Overk, C.R., Oueslati, A., Masliah, E., 2013. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. Nature reviews. Neuroscience 14, 38-48.
Lee, P.C., Bordelon, Y., Bronstein, J., Ritz, B., 2012. Traumatic brain injury, paraquat exposure, and their relationship to Parkinson disease. Neurology 79, 2061-2066.
Lema Tome, C.M., Tyson, T., Rey, N.L., Grathwohl, S., Britschgi, M., Brundin, P., 2013. Inflammation and alpha-synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease--is there a link? Molecular neurobiology 47, 561-574.
Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honore, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Durr, A., Melki, R., Verny, C., Brice, A., 2013. G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. Annals of neurology 73, 459-471.
Lewin, R., 1985. Parkinson's disease: an environmental cause? Science (New York, N.Y.) 229, 257-258.
Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., 2001. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. Biochemistry 40, 11604-11613.
Li, J.Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Bjorklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., Brundin, P., 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. Nature medicine 14, 501-503.

Li, X., Yin, J., Cheng, C.M., Sun, J.L., Li, Z., Wu, Y.L., 2005. Paraquat induces selective dopaminergic nigrostriatal degeneration in aging C57BL/6 mice. Chinese medical journal 118, 1357-1361.
Luk, K.C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J.R., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2009. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 20051-20056.
Lykkebo, S., Jensen, P.H., 2002. Alpha-synuclein and presynaptic function: implications for Parkinson's disease. Neuromolecular medicine 2, 115-129.
Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., Di Monte, D.A., 2002. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. The Journal of biological chemistry 277, 1641-1644.
Maries, E., Dass, B., Collier, T.J., Kordower, J.H., Steece-Collier, K., 2003. The role of [alpha]-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. Nature reviews. Neuroscience 4, 727-738.
Maroteaux, L., Campanelli, J.T., Scheller, R.H., 1988. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. J Neurosci 8, 2804-2815.
Marrinan, S., Emmanuel, A.V., Burn, D.J., 2014. Delayed gastric emptying in Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 29, 23-32.
Marsh, L., 2013. Depression and Parkinson's disease: current knowledge. Current neurology and neuroscience reports 13, 409.
Maturana, M.G., Pinheiro, A.S., de Souza, T.L., Follmer, C., 2015. Unveiling the role of the pesticides paraquat and rotenone on alpha-synuclein fibrillation in vitro. Neurotoxicology 46, 35-43.
Mayo, M.C., Bordelon, Y., 2014. Dementia with Lewy bodies. Seminars in neurology 34, 182-188.
McCann, H., Stevens, C.H., Cartwright, H., Halliday, G.M., 2014. alpha-Synucleinopathy phenotypes. Parkinsonism & related disorders 20 Suppl 1, S62-67.
McCormack, A.L., Di Monte, D.A., 2003. Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration. Journal of neurochemistry 85, 82-86.
Micieli, G., Tosi, P., Marcheselli, S., Cavallini, A., 2003. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology 24 Suppl 1, S32-34.
Minnema, D.J., Travis, K.Z., Breckenridge, C.B., Sturgess, N.C., Butt, M., Wolf, J.C., Zadory, D., Beck, M.J., Mathews, J.M., Tisdel, M.O., Cook, A.R., Botham, P.A., Smith, L.L., 2014. Dietary administration of paraquat for 13 weeks does not result in a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of C57BL/6J mice. Regulatory toxicology and pharmacology : RTP 68, 250-258.
Mohammadi-Bardbori, A., Ghazi-Khansari, M., 2008. Alternative electron acceptors: Proposed mechanism of paraquat mitochondrial toxicity. Environ Toxicol Pharmacol 26, 1-5.
Moisan, F., Kab, S., Mohamed, F., Canonico, M., Le Guern, M., Quintin, C., Carcaillon, L., Nicolau, J., Duport, N., Singh-Manoux, A., Boussac-Zarebska, M., Elbaz, A., 2016. Parkinson disease male-to-female ratios increase with age: French nationwide study and meta-analysis. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 87, 952-957.
Mor, D.E., Ugras, S.E., Daniels, M.J., Ischiropoulos, H., 2016. Dynamic structural flexibility of alpha-synuclein. Neurobiology of disease 88, 66-74.

Morelli, M., 2003. Adenosine A2A antagonists: potential preventive and palliative treatment for Parkinson's disease. Experimental neurology 184, 20-23.
Muntane, G., Ferrer, I., Martinez-Vicente, M., 2012. alpha-synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. Neuroscience 200, 106-119.
Murakami, S., Miyazaki, I., Miyoshi, K., Asanuma, M., 2015. Long-Term Systemic Exposure to Rotenone Induces Central and Peripheral Pathology of Parkinson's Disease in Mice. Neurochemical research 40, 1165-1178.
Myung, W., Lee, G.H., Won, H.H., Fava, M., Mischoulon, D., Nyer, M., Kim, D.K., Heo, J.Y., Jeon, H.J., 2015. Paraquat prohibition and change in the suicide rate and methods in South Korea. PLoS One 10, e0128980.
Nagatsu, T., Sawada, M., 2007. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. Journal of neural transmission. Supplementum, 113-120.
Nagayama, S., Homma, R., Imamura, F., 2014. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. Frontiers in neural circuits 8, 98.
Narkiewicz, J., Giachin, G., Legname, G., 2014. In vitro aggregation assays for the characterization of alpha-synuclein prion-like properties. Prion 8, 19-32.
Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahe, M.M., Derkinderen, P., des Varannes, S.B., Rolli-Derkinderen, M., 2013. The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 10, 90-100.
Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hasegawa, M., 2005. Ubiquitination of alpha-synuclein. Biochemistry 44, 361-368.
Norris, E.H., Giasson, B.I., Hodara, R., Xu, S., Trojanowski, J.Q., Ischiropoulos, H., Lee, V.M., 2005. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. The Journal of biological chemistry 280, 21212-21219.
Norris, E.H., Uryu, K., Leight, S., Giasson, B.I., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2007. Pesticide exposure exacerbates alpha-synucleinopathy in an A53T transgenic mouse model. The American journal of pathology 170, 658-666.
Oates, L., Cohen, M., 2011. Assessing diet as a modifiable risk factor for pesticide exposure. Int J Environ Res Public Health 8, 1792-1804.
Olgiati, S., Thomas, A., Quadri, M., Breedveld, G.J., Graafland, J., Eussen, H., Douben, H., de Klein, A., Onofrj, M., Bonifati, V., 2015. Early-onset parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication: Clinical and genetic findings in a novel family. Parkinsonism & related disorders 21, 981-986.
Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., Wolozin, B., 1999. alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. J Neurosci 19, 5782-5791.
Oueslati, A., 2016. Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? Journal of Parkinson's disease 6, 39-51.
Pal, G., Goetz, C.G., 2013. Assessing bradykinesia in parkinsonian disorders. Frontiers in neurology 4, 54.
Pan-Montojo, F., Schwarz, M., Winkler, C., Arnhold, M., O'Sullivan, G.A., Pal, A., Said, J., Marsico, G., Verbavatz, J.M., Rodrigo-Angulo, M., Gille, G., Funk, R.H., Reichmann, H., 2012. Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. Scientific reports 2, 898.

Pan-Montojo, F.J., Funk, R.H., 2010. Oral administration of rotenone using a gavage and image analysis of alpha-synuclein inclusions in the enteric nervous system. J Vis Exp.
Pankratz, N., Foroud, T., 2007. Genetics of Parkinson disease. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics 9, 801-811.
Papapetropoulos, S., Ellul, J., Paschalis, C., Athanassiadou, A., Papadimitriou, A., Papapetropoulos, T., 2003. Clinical characteristics of the alpha-synuclein mutation (G209A)-associated Parkinson's disease in comparison with other forms of familial Parkinson's disease in Greece. European journal of neurology 10, 281-286.
Parent, M., Parent, A., 2010. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques 37, 313-319.
Park, S.M., Jung, H.Y., Kim, T.D., Park, J.H., Yang, C.H., Kim, J., 2002. Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. The Journal of biological chemistry 277, 28512-28520.
Parkinson, J., 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences 14, 223-236; discussion 222.
Parkkinen, L., Pirttila, T., Alafuzoff, I., 2008. Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance. Acta Neuropathol 115, 399-407.
Parkkinen, L., Pirttila, T., Tervahauta, M., Alafuzoff, I., 2005. Widespread and abundant alpha-synuclein pathology in a neurologically unimpaired subject. Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology 25, 304-314.
Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Poyhonen, M., Paetau, A., 2014. Novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. Neurobiology of aging 35, 2180.e2181-2185.
Paslawski, W., Lorenzen, N., Otzen, D.E., 2016. Formation and Characterization of alpha-Synuclein Oligomers. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 1345, 133-150.
Pearce, R.K., Hawkes, C.H., Daniel, S.E., 1995. The anterior olfactory nucleus in Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 10, 283-287.
Pellegrini, C., Antonioli, L., Colucci, R., Ballabeni, V., Barocelli, E., Bernardini, N., Blandizzi, C., Fornai, M., 2015. Gastric motor dysfunctions in Parkinson's disease: Current pre-clinical evidence. Parkinsonism & related disorders 21, 1407-1414.
Poewe, W., 2008. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. European journal of neurology 15 Suppl 1, 14-20.
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 (New York, N.Y.) 276, 2045-2047.
Ponsen, M.M., Stoffers, D., Twisk, J.W., Wolters, E., Berendse, H.W., 2009. Hyposmia and executive dysfunction as predictors of future Parkinson's disease: a prospective study. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 24, 1060-1065.
Portet, F., Gabelle, A., Touchon, J., 2006. [Parkinson's disease dementia and Lewy body dementia]. Psychologie & neuropsychiatrie du vieillissement 4 Spec No 1, S35-50.

Poryazova, R., Oberholzer, M., Baumann, C.R., Bassetti, C.L., 2013. REM sleep behavior disorder in Parkinson's disease: a questionnaire-based survey. Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine 9, 55-59a.
Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., Rouaud, T., Flamant, M., Toulgoat, F., Roy, M., Vavasseur, F., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., Derkinderen, P., 2012. Analysis of colonic alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy. Parkinsonism & related disorders 18, 893-895.
Powley, T.L., Phillips, R.J., 2002. Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? I. Morphology and topography of vagal afferents innervating the GI tract. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 283, G1217-1225.
Prasad, K., Tarasewicz, E., Mathew, J., Strickland, P.A., Buckley, B., Richardson, J.R., Richfield, E.K., 2009. Toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat accumulation in mouse brain. Experimental neurology 215, 358-367.
Prasad, K., Winnik, B., Thiruchelvam, M.J., Buckley, B., Mirochnitchenko, O., Richfield, E.K., 2007. Prolonged toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat in mouse brain. Environmental health perspectives 115, 1448-1453.
Prigent, A., Lionnet, A., Corbille, A.G., Derkinderen, P., 2017. [Neuropathology and pathophysiology of Parkinson's disease: Focus on alpha-synuclein]. Presse medicale (Paris, France : 1983) 46, 182-186.
Puschmann, A., Ross, O.A., Vilarino-Guell, C., Lincoln, S.J., Kachergus, J.M., Cobb, S.A., Lindquist, S.G., Nielsen, J.E., Wszolek, Z.K., Farrer, M., Widner, H., van Westen, D., Hagerstrom, D., Markopoulou, K., Chase, B.A., Nilsson, K., Reimer, J., Nilsson, C., 2009. A Swedish family with de novo alpha-synuclein A53T mutation: evidence for early cortical dysfunction. Parkinsonism & related disorders 15, 627-632.
Qualman, S.J., Haupt, H.M., Yang, P., Hamilton, S.R., 1984. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. Gastroenterology 87, 848-856.
Quik, M., Bordia, T., O'Leary, K., 2007. Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease. Biochem Pharmacol 74, 1224-1234.
Quik, M., O'Leary, K., Tanner, C.M., 2008. Nicotine and Parkinson's disease: implications for therapy. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 23, 1641-1652.
Quiros-Alcala, L., Bradman, A., Nishioka, M., Harnly, M.E., Hubbard, A., McKone, T.E., Ferber, J., Eskenazi, B., 2011. Pesticides in house dust from urban and farmworker households in California: an observational measurement study. Environmental health : a global access science source 10, 19.
Raghavan, R., Khin-Nu, C., Brown, A., Irving, D., Ince, P.G., Day, K., Tyrer, S.P., Perry, R.H., 1993. Detection of Lewy bodies in Trisomy 21 (Down's syndrome). The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques 20, 48-51.
Ragonese, P., Salemi, G., Morgante, L., Aridon, P., Epifanio, A., Buffa, D., Scoppa, F., Savettieri, G., 2003. A case-control study on cigarette, alcohol, and coffee consumption preceding Parkinson's disease. Neuroepidemiology 22, 297-304.
Rao, M., Gershon, M.D., 2016. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 13, 517-528.

Rey, N.L., Petit, G.H., Bousset, L., Melki, R., Brundin, P., 2013. Transfer of human alpha-synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. Acta Neuropathol 126, 555-573.
Richardson, J.R., Quan, Y., Sherer, T.B., Greenamyre, J.T., Miller, G.W., 2005. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 88, 193-201.
Rihmer, Z., Gonda, X., Dome, P., 2014. Depression in Parkinson's disease. Ideggyogyaszati szemle 67, 229-236.
Ritz, B., Ascherio, A., Checkoway, H., Marder, K.S., Nelson, L.M., Rocca, W.A., Ross, G.W., Strickland, D., Van Den Eeden, S.K., Gorell, J., 2007. Pooled analysis of tobacco use and risk of Parkinson disease. Archives of neurology 64, 990-997.
Rizzoli, S.O., Betz, W.J., 2005. Synaptic vesicle pools. Nature reviews. Neuroscience 6, 57-69.
Roberts, R.F., Wade-Martins, R., Alegre-Abarrategui, J., 2015. Direct visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain. Brain : a journal of neurology 138, 1642-1657.
Rocca, W.A., Bower, J.H., Maraganore, D.M., Ahlskog, J.E., Grossardt, B.R., de Andrade, M., Melton, L.J., 3rd, 2008. Increased risk of parkinsonism in women who underwent oophorectomy before menopause. Neurology 70, 200-209.
Ross, G.W., Abbott, R.D., Petrovitch, H., Morens, D.M., Grandinetti, A., Tung, K.H., Tanner, C.M., Masaki, K.H., Blanchette, P.L., Curb, J.D., Popper, J.S., White, L.R., 2000. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. Jama 283, 2674-2679.
Ross, O.A., Braithwaite, A.T., Skipper, L.M., Kachergus, J., Hulihan, M.M., Middleton, F.A., Nishioka, K., Fuchs, J., Gasser, T., Maraganore, D.M., Adler, C.H., Larvor, L., Chartier-Harlin, M.C., Nilsson, C., Langston, J.W., Gwinn, K., Hattori, N., Farrer, M.J., 2008. Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. Annals of neurology 63, 743-750.
Rossi, M., Merello, M., Perez-Lloret, S., 2015. Management of constipation in Parkinson's disease. Expert opinion on pharmacotherapy 16, 547-557.
Rutherford, N.J., Moore, B.D., Golde, T.E., Giasson, B.I., 2014. Divergent effects of the H50Q and G51D SNCA mutations on the aggregation of alpha-synuclein. Journal of neurochemistry 131, 859-867.
Sakakibara, R., Odaka, T., Uchiyama, T., Asahina, M., Yamaguchi, K., Yamaguchi, T., Yamanishi, T., Hattori, T., 2003. Colonic transit time and rectoanal videomanometry in Parkinson's disease. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 74, 268-272.
Sammons, R.D., Gaines, T.A., 2014. Glyphosate resistance: state of knowledge. Pest Manag Sci 70, 1367-1377.
Sardi, S.P., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S., 2015. Gaucher-related synucleinopathies: the examination of sporadic neurodegeneration from a rare (disease) angle. Progress in neurobiology 125, 47-62.
Sargent, D., Verchere, J., Lazizzera, C., Gaillard, D., Lakhdar, L., Streichenberger, N., Morignat, E., Betemps, D., Baron, T., 2017. 'Prion-like' propagation of the synucleinopathy of M83 transgenic mice depends on the mouse genotype and type of inoculum. Journal of neurochemistry 143, 126-135.
Savitz, D.A., Checkoway, H., Loomis, D.P., 1998. Magnetic field exposure and neurodegenerative disease mortality among electric utility workers. Epidemiology (Cambridge, Mass.) 9, 398-404.

Schemann, M., Neunlist, M., 2004. The human enteric nervous system. Neurogastroenterol Motil 16 Suppl 1, 55-59.
Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P.A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., Auvinen, P., 2015. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 30, 350-358.
Schilder, J.C., Overmars, S.S., Marinus, J., van Hilten, J.J., Koehler, P.J., 2017. The terminology of akinesia, bradykinesia and hypokinesia: Past, present and future. Parkinsonism & related disorders 37, 27-35.
Seidel, K., Mahlke, J., Siswanto, S., Kruger, R., Heinsen, H., Auburger, G., Bouzrou, M., Grinberg, L.T., Wicht, H., Korf, H.W., den Dunnen, W., Rub, U., 2015. The brainstem pathologies of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Brain Pathol 25, 121-135.
Sengupta, J.N., Gebhart, G.F., 1994. Characterization of mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the colon of the rat. Journal of neurophysiology 71, 2046-2060.
Shimizu, K., Matsubara, K., Ohtaki, K., Fujimaru, S., Saito, O., Shiono, H., 2003. Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. Brain Res 976, 243-252.
Shimizu, K., Ohtaki, K., Matsubara, K., Aoyama, K., Uezono, T., Saito, O., Suno, M., Ogawa, K., Hayase, N., Kimura, K., Shiono, H., 2001. Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. Brain Res 906, 135-142.
Shulman, J.M., De Jager, P.L., Feany, M.B., 2011. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. Annual review of pathology 6, 193-222.
Shults, C.W., 2006a. Lewy bodies. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 1661-1668.
Shults, C.W., 2006b. Lewy bodies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 1661-1668.
Silva, R., Carmo, H., Vilas-Boas, V., Barbosa, D.J., Monteiro, M., de Pinho, P.G., de Lourdes Bastos, M., Remiao, F., 2015. Several transport systems contribute to the intestinal uptake of Paraquat, modulating its cytotoxic effects. Toxicology letters 232, 271-283.
Simuni, T., Sethi, K., 2008. Nonmotor manifestations of Parkinson's disease. Annals of neurology 64 Suppl 2, S65-80.
Smith, L.L., 1987. Mechanism of paraquat toxicity in lung and its relevance to treatment. Hum Toxicol 6, 31-36.
Snead, D., Eliezer, D., 2014. Alpha-synuclein function and dysfunction on cellular membranes. Experimental neurobiology 23, 292-313.
Soldner, F., Stelzer, Y., Shivalila, C.S., Abraham, B.J., Latourelle, J.C., Barrasa, M.I., Goldmann, J., Myers, R.H., Young, R.A., Jaenisch, R., 2016. Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of alpha-synuclein modulates target gene expression. Nature 533, 95-99.
Souza, J.M., Giasson, B.I., Chen, Q., Lee, V.M., Ischiropoulos, H., 2000. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. The Journal of biological chemistry 275, 18344-18349.
Specht, C.G., Schoepfer, R., 2001. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. BMC Neurosci 2, 11.
Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M., 1998. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 6469-6473.

Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature 388, 839-840.
Spivey, A., 2011. Rotenone and paraquat linked to Parkinson's disease: human exposure study supports years of animal studies. Environmental health perspectives 119, A259.
Sprenger, F.S., Stefanova, N., Gelpi, E., Seppi, K., Navarro-Otano, J., Offner, F., Vilas, D., Valldeoriola, F., Pont-Sunyer, C., Aldecoa, I., Gaig, C., Gines, A., Cuatrecasas, M., Hogl, B., Frauscher, B., Iranzo, A., Wenning, G.K., Vogel, W., Tolosa, E., Poewe, W., 2015. Enteric nervous system alpha-synuclein immunoreactivity in idiopathic REM sleep behavior disorder. Neurology 85, 1761-1768.
Stefanova, N., Bucke, P., Duerr, S., Wenning, G.K., 2009. Multiple system atrophy: an update. The Lancet. Neurology 8, 1172-1178.
Su, C., Niu, P., 2015. Low doses of single or combined agrichemicals induces alpha-synuclein aggregation in nigrostriatal system of mice through inhibition of proteasomal and autophagic pathways. International journal of clinical and experimental medicine 8, 20508-20515.
Sugeno, N., Takeda, A., Hasegawa, T., Kobayashi, M., Kikuchi, A., Mori, F., Wakabayashi, K., Itoyama, Y., 2008. Serine 129 phosphorylation of alpha-synuclein induces unfolded protein response-mediated cell death. The Journal of biological chemistry 283, 23179-23188.
Surmeier, D.J., Obeso, J.A., Halliday, G.M., 2017. Parkinson's Disease Is Not Simply a Prion Disorder. J Neurosci 37, 9799-9807.
Sveinbjornsdottir, S., 2016. The clinical symptoms of Parkinson's disease. Journal of neurochemistry 139 Suppl 1, 318-324.
Swaminath, P.V., Ragothaman, M., Koshy, S., Sarangmath, N., Adhyam, M., Subbakrishna, D.K., Mathias, C.J., Muthane, U.B., 2010. Urogenital symptoms in Parkinson's disease and multiple system atrophy-Parkinsonism: at onset and later. The Journal of the Association of Physicians of India 58, 86-90.
Takeda, A., Baba, T., Kikuchi, A., Hasegawa, T., Sugeno, N., Konno, M., Miura, E., Mori, E., 2014. Olfactory dysfunction and dementia in Parkinson's disease. Journal of Parkinson's disease 4, 181-187.
Tanner, C.M., 2010. Advances in environmental epidemiology. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 25 Suppl 1, S58-62.
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., Langston, J.W., 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. Environmental health perspectives 119, 866-872.
Tawara, T., Fukushima, T., Hojo, N., Isobe, A., Shiwaku, K., Setogawa, T., Yamane, Y., 1996. Effects of paraquat on mitochondrial electron transport system and catecholamine contents in rat brain. Archives of toxicology 70, 585-589.
Tenreiro, S., Reimao-Pinto, M.M., Antas, P., Rino, J., Wawrzycka, D., Macedo, D., Rosado-Ramos, R., Amen, T., Waiss, M., Magalhaes, F., Gomes, A., Santos, C.N., Kaganovich, D., Outeiro, T.F., 2014. Phosphorylation modulates clearance of alpha-synuclein inclusions in a yeast model of Parkinson's disease. PLoS Genet 10, e1004302.
Thacker, E.L., Chen, H., Patel, A.V., McCullough, M.L., Calle, E.E., Thun, M.J., Schwarzschild, M.A., Ascherio, A., 2008. Recreational physical activity and risk of Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 23, 69-74.

Tielemans, E., Warren, N., Schneider, T., Tischer, M., Ritchie, P., Goede, H., Kromhout, H., Van Hemmen, J., Cherrie, J.W., 2007. Tools for regulatory assessment of occupational exposure: development and challenges. J Expo Sci Environ Epidemiol 17 Suppl 1, S72-80.

Torack, R.M., Morris, J.C., 1992. Tyrosine hydroxylase-like (TH) immunoreactivity in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Journal of neural transmission. Parkinson's disease and dementia section 4, 165-171.

Touchman, J.W., Dehejia, A., Chiba-Falek, O., Cabin, D.E., Schwartz, J.R., Orrison, B.M., Polymeropoulos, M.H., Nussbaum, R.L., 2001. Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element. Genome research 11, 78-86.

Ubeda-Banon, I., Saiz-Sanchez, D., de la Rosa-Prieto, C., Martinez-Marcos, A., 2014. alpha-Synuclein in the olfactory system in Parkinson's disease: role of neural connections on spreading pathology. Brain structure & function 219, 1513-1526.

Uversky, V.N., 2003. A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. Journal of biomolecular structure & dynamics 21, 211-234.

Uversky, V.N., Li, J., Fink, A.L., 2001. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. FEBS letters 500, 105-108.

Van Den Eeden, S.K., Tanner, C.M., Bernstein, A.L., Fross, R.D., Leimpeter, A., Bloch, D.A., Nelson, L.M., 2003. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. American journal of epidemiology 157, 1015-1022.

van der Mark, M., Brouwer, M., Kromhout, H., Nijssen, P., Huss, A., Vermeulen, R., 2012. Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results. Environmental health perspectives 120, 340-347.

van der Mark, M., Vermeulen, R., Nijssen, P.C., Mulleners, W.M., Sas, A.M., van Laar, T., Brouwer, M., Huss, A., Kromhout, H., 2014. Occupational exposure to pesticides and endotoxin and Parkinson disease in the Netherlands. Occupational and environmental medicine 71, 757-764.

van der Mark, M., Vermeulen, R., Nijssen, P.C., Mulleners, W.M., Sas, A.M., van Laar, T., Kromhout, H., Huss, A., 2015. Extremely low-frequency magnetic field exposure, electrical shocks and risk of Parkinson's disease. International archives of occupational and environmental health 88, 227-234.

Vanacore, N., Nappo, A., Gentile, M., Brustolin, A., Palange, S., Liberati, A., Di Rezze, S., Caldora, G., Gasparini, M., Benedetti, F., Bonifati, V., Forastiere, F., Quercia, A., Meco, G., 2002. Evaluation of risk of Parkinson's disease in a cohort of licensed pesticide users. Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology 23 Suppl 2, S119-120.

Varma, D., Sen, D., 2015. Role of the unfolded protein response in the pathogenesis of Parkinson's disease. Acta Neurobiol Exp (Wars) 75, 1-26.

Venda, L.L., Cragg, S.J., Buchman, V.L., Wade-Martins, R., 2010. alpha-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. Trends in neurosciences 33, 559-568.

Vibha, D., Sureshbabu, S., Shukla, G., Goyal, V., Srivastava, A.K., Singh, S., Behari, M., 2010. Differences between familial and sporadic Parkinson's disease. Parkinsonism & related disorders 16, 486-487.

Vilar, M., Chou, H.T., Luhrs, T., Maji, S.K., Riek-Loher, D., Verel, R., Manning, G., Stahlberg, H., Riek, R., 2008. The fold of alpha-synuclein fibrils. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 8637-8642.

Visanji, N., Marras, C., 2015. The relevance of pre-motor symptoms in Parkinson's disease. Expert review of neurotherapeutics 15, 1205-1217.

Visanji, N.P., Brooks, P.L., Hazrati, L.N., Lang, A.E., 2013. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. Acta neuropathologica communications 1, 2.

Visanji, N.P., Marras, C., Hazrati, L.N., Liu, L.W., Lang, A.E., 2014. Alimentary, my dear Watson? The challenges of enteric alpha-synuclein as a Parkinson's disease biomarker. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 29, 444-450.

Wakabayashi, K., Takahashi, H., 1997. Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. European neurology 38 Suppl 2, 2-7.

Wakabayashi, K., Takahashi, H., Ohama, E., Ikuta, F., 1990. Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. Acta Neuropathol 79, 581-583.

Wakabayashi, K., Takahashi, H., Ohama, E., Takeda, S., Ikuta, F., 1993. Lewy bodies in the visceral autonomic nervous system in Parkinson's disease. Adv Neurol 60, 609-612.

Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., Ikuta, F., 1988. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. Acta Neuropathol 76, 217-221.

Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., Ikuta, F., 1989. Lewy bodies in the enteric nervous system in Parkinson's disease. Archives of histology and cytology 52 Suppl, 191-194.

Wang, W., Perovic, I., Chittuluru, J., Kaganovich, A., Nguyen, L.T., Liao, J., Auclair, J.R., Johnson, D., Landeru, A., Simorellis, A.K., Ju, S., Cookson, M.R., Asturias, F.J., Agar, J.N., Webb, B.N., Kang, C., Ringe, D., Petsko, G.A., Pochapsky, T.C., Hoang, Q.Q., 2011. A soluble alpha-synuclein construct forms a dynamic tetramer. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 17797-17802.

Wang, Y., Shi, M., Chung, K.A., Zabetian, C.P., Leverenz, J.B., Berg, D., Srulijes, K., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Siderowf, A.D., Hurtig, H., Litvan, I., Schiess, M.C., Peskind, E.R., Masuda, M., Hasegawa, M., Lin, X., Pan, C., Galasko, D., Goldstein, D.S., Jensen, P.H., Yang, H., Cain, K.C., Zhang, J., 2012. Phosphorylated alpha-synuclein in Parkinson's disease. Science translational medicine 4, 121ra120.

Warren, G.W., Cummings, K.M., 2013. Tobacco and lung cancer: risks, trends, and outcomes in patients with cancer. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 359-364.

Waxman, E.A., Giasson, B.I., 2008. Specificity and regulation of casein kinase-mediated phosphorylation of alpha-synuclein. J Neuropathol Exp Neurol 67, 402-416.

Weinreb, P.H., Zhen, W., Poon, A.W., Conway, K.A., Lansbury, P.T., Jr., 1996. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. Biochemistry 35, 13709-13715.

Wills, J., Credle, J., Oaks, A.W., Duka, V., Lee, J.H., Jones, J., Sidhu, A., 2012. Paraquat, but not maneb, induces synucleinopathy and tauopathy in striata of mice through inhibition of proteasomal and autophagic pathways. PLoS One 7, e30745.

Wirdefeldt, K., Adami, H.O., Cole, P., Trichopoulos, D., Mandel, J., 2011. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. European journal of epidemiology 26 Suppl 1, S1-58.

Wong, S.L., Gilmour, H., Ramage-Morin, P.L., 2014. Parkinson's disease: Prevalence, diagnosis and impact. Health reports 25, 10-14.
Wong, Y.C., Krainc, D., 2017. alpha-synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. Nature medicine 23, 1-13.
Wood, H., 2015. Parkinson disease. Gut reactions--can changes in the intestinal microbiome provide new insights into Parkinson disease? Nat Rev Neurol 11, 66.
Wooten, G.F., Currie, L.J., Bovbjerg, V.E., Lee, J.K., Patrie, J., 2004. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 75, 637-639.
Wu, S.T., Ma, Y., Zhang, K., Zhang, J.G., 2012. Effect of deep brain stimulation on substantia nigra neurons in a rat model of Parkinson's disease. Chinese medical journal 125, 4072-4075.
Xie, H., Wang, R., Tang, X., Xiong, Y., Xu, R., Wu, X., 2012. Paraquat-induced pulmonary fibrosis starts at an early stage of inflammation in rats. Immunotherapy 4, 1809-1815.
Yamin, G., Uversky, V.N., Fink, A.L., 2003. Nitration inhibits fibrillation of human alpha-synuclein in vitro by formation of soluble oligomers. FEBS letters 542, 147-152.
Yang, W., Tiffany-Castiglioni, E., 2005. The bipyridyl herbicide paraquat produces oxidative stress-mediated toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: relevance to the dopaminergic pathogenesis. Journal of toxicology and environmental health. Part A 68, 1939-1961.
Yu, Q., Cairns, A., Powles, S., 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a Lolium rigidum biotype. Planta 225, 499-513.
Yu, Y.B., Li, Y.Q., 2014. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. World journal of gastroenterology 20, 11273-11280.
Zhang, H., Griggs, A., Rochet, J.C., Stanciu, L.A., 2013. In vitro study of alpha-synuclein protofibrils by cryo-EM suggests a Cu(2+)-dependent aggregation pathway. Biophys J 104, 2706-2713.
Zhang, M., Zhao, J., Zheng, J., 2014. Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides. Soft Matter 10, 7425-7451.
Zhu, Y., Zhang, J., Zeng, Y., 2012. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. CNS & neurological disorders drug targets 11, 350-358.

Résumé

La maladie de Parkinson (MP) appartient à la famille des α-synucléinopathies. Ces pathologies ont en commun d'être liées à l'α-synucléine (α-syn), protéine neuronale dont les rôles précis sont encore mal définis. Dans un contexte où des pesticides, comme le paraquat, ont été liés épidémiologiquement au déclenchement précoce de la MP chez des agriculteurs, certaines substances sont devenues des substances de référence dans les études portant sur les synucléinopathies. Le paraquat induit une pathologie parkinsonienne comprenant des agrégations de l'α-syn ou des pertes spécifiques de neurones dopaminergiques. Dans nos études nous avons premièrement mis en place un modèle d'exposition par voie orale au paraquat en utilisant l'administration. Par la suite nous avons étudié les effets de cette administration orale au paraquat sur le système nerveux entérique présent dans l'intestin de souris C57Bl/6 et transgénique TgM83. Cette lignée transgénique possède la particularité de développer spontanément une synucléinopathie, simultanément dans l'intestin et le cerveau, présentant des dépôts d'α-syn phosphorylée. L'ingestion du paraquat induit une accélération de l'apparition de la synucléinopathie entérique. Dans une seconde étude biochimique, nous montrons que l'exposition orale au paraquat induit une augmentation globale des niveaux d'α-syn totale dans le système nerveux central et entérique des souris.

Nous montrons ici les effets délétères de l'exposition orale au paraquat sur l'intestin en lien avec l'α-syn, par l'accélération d'une synucléinopathie mais aussi par l'induction d'une réponse générale, cérébrale et entérique, traduite par une hausse des niveaux d'α-syn.

Mots clé : Maladie de Parkinson, pesticides, synucléine, entérique, cerveau.

Title: Molecular impact of subchronic oral exposure to a pesticide, paraquat, in a transgenic mouse model of human synucleinopathy. Involvement of enteric nervous system

Abstract: Parkinson's disease (PD) belongs to the α-synucleinopathies family. These pathologies have in common that they are linked to α-synuclein (α-syn), a neuronal protein whose precise roles are poorly defined. Some pesticides, such as paraquat, have been epidemiologically linked to the early onset of PD in farmers; some substances have become essential in the studies of synucleinopathies. Paraquat induces parkinsonian pathologies including α-syn aggregations or specific dopaminergic neurons loss. In our studies, we first set up a model of oral exposure to paraquat by drinking water. Subsequently, we studied the effects of this oral administration to paraquat on the enteric nervous system of the intestine of C57Bl/6 and TgM83 transgenic mice. This transgenic line has the peculiarity of simultaneously and spontaneously developing a synucleinopathy in the intestine and in the brain, displaying deposits of phosphorylated α-syn. The oral ingestion of paraquat induces acceleration in the appearance of enteric synucleinopathy. In a second biochemical study, we show that oral exposure to paraquat induces an overall increase in total α-syn levels in the central and enteric nervous systems of mice.

Our results show the deleterious effects of paraquat oral administration on the intestine in relation to α-syn, by the acceleration of synucleinopathy but also by the induction of a widespread cerebral and enteric response, shown by an increase in cellular levels of α-syn.

Keywords: Parkinson's disease, pesticides, synuclein, enteric, brain