



**HAL**  
open science

## Les marqueurs biologiques de l'atrophie multisystématisée

Brice Laurens

► **To cite this version:**

Brice Laurens. Les marqueurs biologiques de l'atrophie multisystématisée. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01084181

**HAL Id: dumas-01084181**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01084181>**

Submitted on 18 Nov 2014

**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.



UNIVERSITE DE BORDEAUX

U.F.R des Sciences Médicales

Année 2014

Thèse n° 3063

Thèse pour l'obtention du

**DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE**

Diplôme d'Etudes Spécialisées en Neurologie

Présentée et soutenue publiquement le 15 septembre 2014 par

**Brice LAURENS**

Né le 24 avril 1986 à Rodez (12)

# **Les marqueurs biologiques de l'atrophie multisystématisée**

Directeur de Thèse

**Monsieur le Professeur Wassilios Meissner**

## **Jury**

Monsieur le Professeur François TISON

Président du Jury

Monsieur le Professeur Gwendal LE MASSON

Juge

Madame le Docteur Alexandra FOUBERT-SAMIER

Juge

Monsieur le Docteur Olivier FLABEAU

Rapporteur

**TITRE :** Les marqueurs biologiques de l'atrophie multisystématisée

**RESUME :**

Introduction : L'atrophie multisystématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative au pronostic péjoratif. Aucun marqueur biologique ne permet de la différencier des autres syndromes parkinsoniens neurodégénératifs. L'objectif était d'établir une revue concernant la recherche d'un marqueur biologique de l'AMS dans le cadre du protocole BIOAMS qui vise à comparer l' $\alpha$ -synucléine totale et oligomérique chez les AMS par rapport aux sujets sains.

Méthodes : L' $\alpha$ -synucléine totale et oligomérique du liquide cébrospinal et du sang sont comparées chez des sujets AMS aux contrôles appariés en âge et en sexe. La technique de dosage est immunoenzymatique. Une recherche Pubmed a été faite jusqu'au 05/08/2014 afin de synthétiser et analyser les données de la littérature concernant les candidats biomarqueurs de l'AMS.

Résultats : L'inclusion des témoins n'est pas terminée, les résultats biologiques de BIOAMS viendront prochainement. Il a été trouvé 1526 articles dont 67 sont présentés. L' $\alpha$ -synucléine totale semble diminuée chez les AMS par rapport aux contrôles, sans différence avec la maladie de Parkinson et les syndromes parkinsoniens atypiques. Seules deux travaux préliminaires ont étudié ses formes dérivées (phosphorylée, oligomérique), les résultats semblent prometteurs. D'autres molécules semblent démarquer ces affections : protéines du neurofilament, DJ-1, marqueurs de l'inflammation et du métabolisme...

Discussion : L' $\alpha$ -synucléine totale seule ne semblerait pas suffire pour être biomarqueur de l'AMS ; ses formes dérivées sont plus prometteuses mais nécessitent confirmation par des études à protocoles standardisés. Ceci souligne l'intérêt des résultats de BIOAMS qui viendront prochainement. D'autres molécules pourraient être utiles mais les études nécessitent réplication, les résultats différant parfois lorsque le protocole est réévalué. Une combinaison de biomarqueurs sera probablement nécessaire pour aboutir à un marquage sensible et spécifique.

**Mots clés :**

Atrophie multisystématisée ; alpha-synucléine ; Maladie de Parkinson ; biomarqueurs ; marqueurs biologiques ; DJ-1 ; TAU ; syndrome parkinsonien ; syndrome parkinsonien atypique.

**TITLE:** Biomarkers of Multiple System Atrophy

**ABSTRACT:**

Objective: Multiple system atrophy (MSA) is a neurodegenerative disorder with poor prognosis; no biological marker is currently able to differentiate MSA from other neurodegenerative parkinsonian disorders. The aim of this work was to review candidate biomarkers of MSA in the framework of the BIOAMS protocol which assesses levels of total and oligomeric  $\alpha$ -synuclein in MSA subjects and controls.

Methods: Total and oligomeric  $\alpha$ -synuclein levels in the cerebrospinal fluid and plasma will be compared between MSA patients and matched controls based on an enzyme-linked immunosorbent assay. A Pubmed search was performed until 08.05.2014 to review the literature with regard to candidate biomarkers of MSA.

Results and discussion: The inclusion of controls is ongoing and the results are expected for 2015. A total of 1526 articles were found, 67 of these were selected for a detailed analysis. According to the results of several studies, total  $\alpha$ -synuclein levels are decreased in the cerebrospinal fluid of MSA patients compared to controls. Preliminary results suggest that oligomeric and phosphorylated  $\alpha$ -synuclein species are more promising candidate biomarkers for MSA than total levels. Other candidate biomarkers may prove useful (neurofilament proteins, DJ-1...) but studies need replication because of conflicting results (for example Flt3 ligand). Finally, a combination of different markers may prove useful for achieving high diagnostic sensitivity and specificity.

**Keywords:**

Multiple System Atrophy ; alpha-synuclein ; Parkinson's Disease ; biomarkers ; biological markers ; DJ-1 ; TAU ; parkinsonism ; atypical parkinsonian disorders.

## Remerciements

A Monsieur le Professeur François TISON,

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse, de me donner la possibilité de continuer à apprendre et travailler à vos côtés. Veuillez trouver ici l'expression de mon enthousiasme et de ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Wassilios MEISSNER,

D'avoir accepté de me guider dans ce travail, de me permettre de continuer à apprendre et travailler à vos côtés. Je tiens à vous témoigner de ma reconnaissance et de mon respect.

A Monsieur le Professeur Gwendal LE MASSON, Madame le Dr Alexandra FOUBERT-SAMIER, Monsieur le Dr Olivier FLABEAU,

Vous me faites l'honneur de votre présence et de juger cette thèse.

A mes maîtres d'internat,

Professeur TISON, Professeur LE MASSON,

Professeur SIBON,

Professeur BURBAUD, Professeur GUEHL,

Professeur DEHAIL, Professeur MAZAUX,

Docteur MARCHAL, Docteur FERRER,

Docteur BONNAN, Docteur BERTANDEAU,

Docteur ANTONIOL, Docteur DELOGE,

Pour m'avoir accueilli au sein de votre unité et ainsi contribué à ma formation.

A tous mes autres formateurs (Dr MOULKI, Dr AUPY, Dr DE MONTAUDOIN, Dr DELLECI, Dr BARROSO, Dr DESMASLES, Dr KRIM, Dr FLEURY, Dr RENOU, Dr DEBRUXELLE, Dr MICHEL, Dr ROUANET), et au Dr CUBIZOLLE pour tout et m'apprendre à savoir « jeter un œil ».

A mes co-internes (Xavier, Paul, Florent, Caroline, Jennifer, Idoia, Marguerite). Aux deux Sandrine.

A tous mes proches bien sûr, pour tout, du début à la fin : mes Parents, Chrislène, Jérémy, Lucie.

## Sommaire

Liste des tableaux .....	7
I- Atrophie multisystématisée : généralités, anatomopathologie, physiopathologie .....	8
a. Généralités .....	8
1. Présentation générale .....	8
2. Epidémiologie .....	8
3. Clinique .....	9
4. Paraclinique .....	11
5. Critères diagnostiques .....	12
6. Prise en charge thérapeutique .....	15
b. Anatomopathologie .....	15
c. Rôle physiopathologique de l' $\alpha$ -synucléine .....	17
1. Alpha-synucléine en situation normale .....	17
2. Alpha-synucléine en situation pathologique .....	18
3. Différences physiopathologiques entre AMS et MPI/DCL .....	21
4. Hypothèse physiopathologique et autres dysfonctionnements cellulaires .....	21
II- Intérêts d'un biomarqueur .....	23
a. Intérêt diagnostique .....	23
b. Intérêt pronostique .....	23
c. Intérêt thérapeutique et de recherche .....	23
d. Intérêt d'un biomarqueur de l'AMS en particulier .....	24
e. Critères de qualité d'un biomarqueur .....	24
III- Objectifs et méthodologie de la recherche .....	25
a. Objectifs .....	25
b. Méthodes .....	25
IV- Candidats biomarqueurs de l'AMS : revue de la littérature .....	26
a. Alpha-synucléine .....	26
1. Dans le LCR .....	26
2. Dans le sang .....	32
3. Méthodes de dosage .....	33
b. Autres candidats biomarqueurs .....	35
1. En lien avec la physiopathologie .....	35
2. Marqueurs de la dégénérescence .....	47
3. Autres candidats biomarqueurs : en lien avec des structures spécifiques .....	53

4. Autres candidats biomarqueurs : sans lien avec une structure spécifique .....	56
V- Description du protocole BIOAMS .....	57
a. Introduction .....	57
b. Objectifs .....	57
c. Méthodes .....	58
d. Résultats .....	60
e. Discussion concernant le protocole BIOAMS.....	61
VI- Discussion et perspectives .....	63
a. Synthèse de la littérature .....	63
b. Analyse des échecs .....	65
c. Combinaison de biomarqueurs .....	66
1. Avec l' $\alpha$ -synucléine .....	66
2. Sans l' $\alpha$ -synucléine .....	68
d. Choix du marqueur biologique selon la problématique clinique.....	70
e. Perspectives de recherche.....	71
VII- Conclusion.....	72
VIII- Abréviations .....	73
IX- Annexes .....	74
Annexe I : UMSARS .....	74
Annexe II : Echelle de qualité de vie de Schrag (QoL-AMS).....	83
X- Bibliographie .....	86



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Alpha-synucléine totale dans le LCR .....	28
Tableau 2 : Autres formes d' $\alpha$ -synucléine dans le LCR .....	31
Tableau 3 : Alpha-synucléine totale plasmatique .....	32
Tableau 4 : Peptide précurseur de l'amyloïde et dérivés dans le LCR .....	37
Tableau 5 : DJ-1 dans le LCR .....	39
Tableau 6 : Marqueurs de la neuroinflammation .....	42
Tableau 7 : Marqueurs du stress oxydatif .....	43
Tableau 8 : Polyamines et acides gras polyinsaturés dans le LCR .....	46
Tableau 9 : Métabolome .....	47
Tableau 10 : Protéine TAU totale (tTAU) dans le LCR .....	49
Tableau 11 : Protéine TAU phosphorylée (pTAU) dans le LCR.....	50
Tableau 12 : Protéines du neurofilament dans le LCR .....	52
Tableau 13 : Neurotransmetteurs et leurs métabolites dans le LCR .....	55
Tableau 14 : Combinaison de biomarqueurs avec l' $\alpha$ -synucléine.....	67
Tableau 15 : Combinaison de biomarqueurs sans l' $\alpha$ -synucléine.....	69

# **I- Atrophie multisystématisée : généralités, anatomopathologie, physiopathologie**

## **a. Généralités**

### **1. Présentation générale**

Le terme « atrophie multisystématisée » (AMS) a été utilisé pour la première fois en 1969 par Graham et Oppenheimer comme terme général pour désigner trois maladies comportant une atrophie neuronale avec une variété de combinaisons se chevauchant : l'atrophie olivopontocérébelleuse, la dégénérescence nigrostriatale, le syndrome de Shy-Drager. Initialement créé dans l'idée d'une « convention temporaire », ce terme est resté par la suite grâce aux travaux de Papp et associés lorsqu'ils ont découvert les Inclusions Gliales Cytoplasmiques (IGC) de ces patients, inclusions considérées aujourd'hui comme la marque anatomopathologique principale de cette pathologie. L'étape fondamentale suivante a été la découverte de l'alpha-synucléine ( $\alpha$ -synucléine,  $\alpha$ -syn) comme composant principal de ces inclusions, rattachant l'AMS aux synucléinopathies.

Les synucléinopathies sont un ensemble de pathologies qui ont en commun la présence d'agrégats protéiques contenant de l' $\alpha$ -synucléine pour principal constituant. Les trois principales pathologies de ce groupe sont la Maladie de Parkinson Idiopathique (MPI), la Démence à Corps de Lewy (DCL), et l'AMS. Dans la MPI et la DCL, les agrégats sont les Corps de Lewy (CDL) et sont principalement retrouvés dans les neurones. Dans l'AMS, les agrégats sont les IGC situées au sein des oligodendrocytes.

### **2. Epidémiologie**

Il s'agit d'une maladie de l'adulte, sporadique. Elle est rare : sa prévalence est de 2 à 5/100 000 habitants.<sup>1,2</sup> Elle se déclare le plus souvent entre 50 et 60 ans, les dernières données rapportant un âge moyen à l'installation des symptômes de  $56,2 \pm 8,4$  ans<sup>3</sup> ; les hommes semblent plus affectés que les femmes.<sup>1-3</sup> La forme avec syndrome parkinsonien prédominant (AMS-P) est plus fréquente en Europe que celle avec syndrome cérébelleux prédominant (AMS-C) : 62% vs. 38%.<sup>3</sup>

L'évolution de l'AMS se fait inexorablement vers une aggravation : il n'existe pas de traitement stoppant ou modifiant le processus évolutif. Le pronostic fonctionnel est grave : après l'installation des premiers symptômes, une aide à la marche sera nécessaire en 3 ans en moyenne, un fauteuil roulant en 4 à 6 ans, et le patient sera confiné au lit en 8 ans en moyenne.<sup>4</sup> Le pronostic vital est également sombre: la survie médiane était jusqu'ici évaluée à entre 5,8 et 9,5 ans,<sup>5-7</sup> les dernières données de la

littérature suggèrent un délai très légèrement plus long (9,8 ans) entre le premier symptôme et le décès.<sup>3</sup>

Plusieurs facteurs pronostiques ont jusqu'ici été décrits. Seraient des facteurs de mauvais pronostic :

- un début jeune, des antécédents endocriniens, une dysphagie, et le stade Hoehn et Yahr égal à 5.<sup>8</sup>
- une atteinte dysautonomique précoce.<sup>4,9</sup>
- la forme AMS-P a un pronostic fonctionnel plus médiocre par rapport aux AMS-C.<sup>4</sup>
- plus récemment, les facteurs pronostiques principaux relevés sont une forme parkinsonienne et une vidange incomplète de vessie, mais aussi une courte durée d'évolution entre l'apparition des symptômes et le diagnostic, ainsi qu'une absence de réponse à la lévodopa.<sup>3</sup>

### **3. Clinique**

#### *La dysautonomie*

Par définition, tous les patients sont affectés par des symptômes dysautonomiques. Les symptômes les plus fréquents sont une atteinte vésicosphinctérienne (88% des sujets), sous la forme d'une incontinence urinaire (73%) et une vidange incomplète de vessie (51%).<sup>3</sup> Suit la constipation comme symptôme de dysautonomie en termes de fréquence (58,2%). Un autre symptôme majeur de la dysautonomie est l'hypotension orthostatique, chez environ 57% des sujets au début du suivi.<sup>3</sup> D'autres symptômes de dysautonomie pourraient précéder l'installation des troubles moteurs pour constituer la phase prémotrice de la maladie<sup>10</sup> : dysfonction érectile, stridor nocturne, apnées obstructives du sommeil et apnées centrales. Le premier symptôme de dysautonomie à apparaître semblerait être la dysfonction érectile.<sup>11</sup> Enfin, une autre revue rappelle qu'il peut exister des troubles digestifs autres que la constipation déjà évoquée, notamment la gastroparésie. Ainsi que des troubles de la thermorégulation.<sup>12</sup>

#### *Le syndrome parkinsonien*

Le syndrome parkinsonien est présent, d'après les plus récentes données européennes, chez la très grande majorité des patients (90,8%), le symptôme accompagnant la bradykinésie le plus souvent rapporté étant la rigidité (83%) plus que le tremblement de repos (35%), symptôme prenant plus souvent la forme d'un tremblement myoclonique qu'un tremblement de repos asymétrique typique de la MPI. Ce syndrome parkinsonien est le plus souvent résistant aux traitements dopaminergiques, bien qu'environ un tiers des patients soit sensible à la lévodopa pendant environ trois ans et demi.<sup>3</sup>

### *Le syndrome cérébelleux*

Le syndrome cérébelleux est présent chez 71,6% des patients (54% des formes parkinsoniennes, et par définition 100% des formes cérébelleuses). L'ataxie à marche (61,7%) est le symptôme le plus fréquent de cette atteinte, suivi par l'ataxie des membres (56%) puis la dysarthrie (54,6%).<sup>3</sup>

### *Formes cliniques*

Selon la prédominance du syndrome parkinsonien ou du syndrome cérébelleux, on distingue les AMS de type parkinsoniennes appelées « AMS-P » des AMS de type cérébelleuses appelées « AMS-C ». En occident, l'AMS-P est la plus fréquente des deux (62%)<sup>3</sup> alors qu'au Japon la forme AMS-C semble être la plus fréquente des deux (83,8% au début de la maladie).<sup>13</sup> Ces formes sont bien définies par une prédominance des symptômes, ceux-ci cohabitent fréquemment : dans environ un cas sur deux (54%) des patients avec la forme AMS-P, on retrouvait un syndrome cérébelleux ; et plus fréquemment encore dans le sens inverse (76%).<sup>3</sup> Lorsqu'aucune des deux ne semble prédominer, certains auteurs les appellent « AMS mixtes » (AMS-P+C).

### *Autres symptômes moteurs*

Le syndrome pyramidal est présent chez environ un patient sur deux (49,7%), le plus souvent sous la forme d'une hyperréflexie ostéotendineuse, le signe de Babinski n'étant présent que chez moins d'un tiers des patients.<sup>3</sup> Les autres troubles moteurs sont représentés par des myoclonies, une dystonie dont la forme la plus typique est l'antécolis, ou bien encore la dysarthrie qui est mixte (cérébelleuse et parkinsonienne).<sup>12</sup>

### *Les troubles respiratoires et du sommeil*

Les troubles respiratoires et les troubles du sommeil de l'AMS sont de découverte plus récente mais aujourd'hui relativement bien documentés. Ils sont multiples : sommeil fragmenté et réduit en durée, somnolence diurne excessive, stridor inspiratoire (qui peut être diurne ou nocturne)<sup>10,12,14</sup> ; un trouble du comportement en sommeil paradoxal est également présent chez quasiment tous les patients.<sup>15-17</sup>

### *Les troubles cognitifs*

Les patients atteints d'AMS peuvent présenter des troubles cognitifs. Les AMS-P+C présentent souvent des troubles des fonctions exécutives, parfois des troubles de l'attention et de la mémoire de travail, des troubles visuospatiaux, de la mémoire de rappel spontané immédiat et différé, et de la reconnaissance. Les AMS-P présentent sensiblement les mêmes troubles cognitifs (fonctions exécutives, mémoire de travail, visuospatiaux, etc.), avec quelques différences entre AMS-P (troubles du rappel immédiat spontané) et AMS-C (troubles du rappel spontané différé, de la reconnaissance).<sup>18</sup>

### *Les douleurs*

Les douleurs sont aussi présentes dans cette affection, et sont connues depuis de nombreuses années. Leur origine peut être multiple.<sup>19</sup>

### *Les échelles quantitatives*

Il a été nécessaire de développer des échelles afin de caractériser cliniquement les patients de la manière la plus objective possible. Pour évaluer la dysautonomie, plusieurs échelles existent : SCOPA-AUT (pour Scales for the Outcomes in Parkinson's disease – Autonomic)<sup>20</sup> est très couramment utilisée en routine clinique ; il existe une autre échelle qui est la COMPASS 31 (Composite Autonomic Symptom Score, composée de 31 questions extraites d'un questionnaire plus vaste de 169 questions qu'est le 169-item Autonomic Symptom Profile).<sup>21</sup> L'atteinte motrice est habituellement quantifiée par le score Unified Multiple System Atrophy Rating Scale (UMSARS), dans sa seconde partie (UMSARS-II) pour ce qui est de l'atteinte extrapyramidale et cérébelleuse. Certains auteurs utilisaient parfois, essentiellement avant la validation de l'UMSARS, son pendant pour la MPI, l'Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) dans sa troisième partie (UPDRS-III). La qualité de vie liée à la santé est fortement altérée dans l'AMS et des échelles ont donc été mise au point, notamment la Quality of Life in Multiple System Atrophy (QoL-AMS)<sup>22</sup> puis validée en français.<sup>23</sup>

## **4. Paraclinique**

Bien que le diagnostic soit essentiellement clinique, les examens complémentaires permettent parfois d'étayer le diagnostic.

Du point de vue de l'imagerie structurelle, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est la technique ayant la meilleure résolution, même si elle peut être normale en début d'évolution. L'atrophie est principalement visible sur les régions du pont, du cervelet et des pédoncules cérébelleux moyens, ces éléments ayant une excellente spécificité pour les distinguer des autres syndromes parkinsoniens neurodégénératifs.<sup>24</sup> Les anomalies de signal consistent en un hyposignal T2 putaminal dorsolatéral avec hypersignal du bord latéral de ce putamen,<sup>25</sup> plus particulièrement visible en T2\*,<sup>26</sup> un signe de la croix pontique qui correspond à la dégénérescence des noyaux du pont. Ces différentes anomalies semblent apparaître selon une séquence relativement bien définie au cours du temps et pourraient donc être un certain reflet de l'évolution de la maladie.<sup>27</sup>

La dénervation dopaminergique présynaptique peut être objectivée par la tomoscintigraphie d'émission monophotonique (TEMP),<sup>28</sup> bien qu'elle ne puisse pas différencier les syndromes parkinsoniens neurodégénératifs entre eux. L'AMS est aussi caractérisée par un hypométabolisme putaminal et/ou cérébelleux lorsque l'on réalise une Tomographie par Emission de Positons (TEP) avec du fluorodésoxyglucose marqué au fluor 18 (TEP-FDG).<sup>29</sup>

Enfin, il peut parfois être nécessaire de réaliser des examens complémentaires afin d'objectiver la dysautonomie :

- dysautonomie cardiovasculaire : la HAS recommande des tests au lit du malade (mesures de la variabilité de la fréquence cardiaque à la respiration et mesure de la pression artérielle avec calcul du rapport 30/15 lors du passage à l'orthostatisme). Lorsque ces deux tests sont anormaux, alors la dysautonomie cardiovasculaire neurogène est confirmée. Sinon, il est nécessaire de compléter par d'autres investigations, mais qui ne se font pas en service clinique de routine. Il peut également être effectuée une mesure ambulatoire de la pression artérielle avec capteur de position, qui montrera chez un grand nombre de patients AMS une disparition du cycle nyctéméral des variations tensionnelles. Enfin, s'il persiste un doute sur une dysautonomie entre une MPI et une AMS, il est possible de réaliser une scintigraphie cardiaque au [123I]-méta-iodobenzyl-guanidine (MIBG) qui sera normale dans l'AMS (dénervation pré ganglionnaire) et altérée dans la MPI (dénervation post ganglionnaire).<sup>30</sup>
- électromyogramme périnéal (montrant la dénervation du sphincter anal, caractéristique de l'AMS, par dégénérescence du noyau sacré d'Onuf). Cet examen est très rarement fait en pratique clinique.
- bilan urodynamique afin de déterminer l'existence et le type de troubles vésicosphinctériens d'origine neurologique, la plainte des patients étant parfois très aspécifique.

## **5. Critères diagnostiques**

Le diagnostic de certitude de l'AMS est histologique. Il repose sur l'analyse anatomopathologique post-mortem montrant la présence diffuse et abondante dans le système nerveux central d'IGC positives sur l' $\alpha$ -synucléine en immunomarquage, associée à des modifications neurodégénératives dans les structures nigrostriées et olivopontocérébelleuses. Ceci reste valable en l'absence de manifestations cliniques d'AMS. L'importance de l'immunomarquage de l' $\alpha$ -synucléine des IGC est majeure, notamment à visée de diagnostic différentiel envers des pathologies comme la PSP et la DCB, elles-aussi caractérisées par des inclusions dans les oligodendrocytes contenant de l'ubiquitine et la p62 ; mais ces inclusions-là sont essentiellement constituées de protéine TAU (Tubule-Associated Unit) et non pas d' $\alpha$ -synucléine.

En pratique quotidienne, le diagnostic de l'AMS ne peut être fait en anatomopathologie, il est clinique. Il repose donc sur la présence d'une dysautonomie et de sa combinaison variable avec un syndrome parkinsonien et/ou un syndrome cérébelleux, et de signes additionnels en cas de diagnostic d'AMS possible. L'association des signes sus-cités permet une gradation de probabilité<sup>31-33</sup> :

- Critères de consensus pour le diagnostic d'AMS probable,<sup>31</sup> chez un adulte de plus de 30 ans de façon sporadique et progressive :

Atteinte clinique	Définie par :		
<b>Dysfonction du système nerveux autonome</b>	Incontinence urinaire (avec troubles érectiles chez les hommes)		
	Ou		
	Hypotension orthostatique dans les 3 minutes suivant le passage à l'orthostatisme : > 30mmHg sur la pression artérielle systolique et/ou > 15mmHg sur la diastolique		
<b>Et</b>			
<b>Soit un syndrome parkinsonien avec mauvaise réponse à la lévodopa</b>	Bradykinésie		
	Et au moins un parmi :		
	Tremblement de repos	Rigidité	Instabilité posturale
<b>Soit un syndrome cérébelleux</b>	Ataxie à la marche		
	Avec		
	Dysmétrie de membre(s)	Dysarthrie cérébelleuse	Dysfonction oculomotrice cérébelleuse

- Critères consensuels pour le diagnostic d'AMS possible,<sup>31</sup> chez un adulte de plus de 30 ans, de façon sporadique et progressive :

Atteinte clinique	Définie par		
<b>Syndrome parkinsonien</b>	Bradykinésie		
	Et au moins un parmi :		
	Tremblement de repos	Rigidité	Instabilité posturale
<b>Ou</b>			
<b>Syndrome cérébelleux</b>	Au moins un parmi :		
	Ataxie à la marche avec dysarthrie cérébelleuse	Dysmétrie de membre(s)	Dysfonction oculomotrice cérébelleuse
<b>Et</b>			
<b>Au moins un élément suggérant une dysautonomie</b>	Urgenturies inexplicables par ailleurs		
	Hypotension orthostatique (mais ne remplissant pas les critères d'AMS probable)		
	Pollakiurie et vidange vésicale incomplète		
	Dysfonction érectile chez les hommes		
<b>Et</b>			
<b>Au moins un critère additionnel parmi :</b>	AMS-P ou AMS-C « possible »	Syndrome pyramidal	
		Stridor	
	AMS-P « possible »	Syndrome parkinsonien rapidement progressif	
		Réponse pauvre à la lévodopa	
		Instabilité posturale dans les 3 ans suivant le début des signes moteurs	
		Ataxie à la marche, dysarthrie cérébelleuse, ataxie des membres ou dysfonction oculomotrice cérébelleuse	
		Dysphagie dans les 5 ans suivant le début des signes moteurs	
		IRM cérébrale : atrophie du putamen, des pédoncules cérébelleux moyens, du pont, du cervelet	
	AMS-C « possible »	TEP-FDG : hypométabolisme dans le putamen, le tronc cérébral ou le cervelet	
		Syndrome parkinsonien (bradykinésie et rigidité)	
		IRM cérébrale : atrophie du putamen, des pédoncules cérébelleux moyens, du pont, du cervelet	
		TEP-FDG : hypométabolisme dans le putamen	
		Dénervation dopaminergique présynaptique nigrostriée en TEMP ou TEP	



## 6. Prise en charge thérapeutique

Une revue récente en fait la synthèse.<sup>34</sup> Il n'existe, à l'heure actuelle, aucune thérapeutique pouvant modifier le cours évolutif de la maladie. Seuls les traitements symptomatiques apportent un bénéfice clinique.

Le traitement du syndrome parkinsonien peut parfois être amélioré par la lévodopa.<sup>35,36</sup> Les données les plus récentes rapportent que cela se produit chez environ un tiers des patients, et ce pour une durée moyenne d'environ 3,5 ans.<sup>3</sup> Certains d'entre eux développeront même des complications motrices,<sup>3</sup> essentiellement des dyskinésies bucco faciales.

Le traitement du syndrome cérébelleux repose principalement sur la physiothérapie à type de kinésithérapie motrice.<sup>37</sup>

Les symptômes de dysautonomie sont également importants à prendre en charge. Concernant les troubles vésicosphinctériens, en cas de résidu post mictionnel supérieur à 100cc, des auto ou hétéro sondages évacuateurs peuvent être proposés; si le résidu post mictionnel est négligeable, le traitement est adapté au bilan urodynamique: l'hyperactivité détrusorienne peut être traitée par anticholinergique, et l'hyperactivité vésicale par alpha-bloquants,<sup>34</sup> bien que ceux-ci sont souvent incompatibles avec l'hypotension orthostatique des patients AMS. Concernant l'hypotension orthostatique, les mesures non médicamenteuses sont à appliquer en première intention (bas de contention, hydratation, proclive de 30° nocturne)<sup>38-40</sup>; en cas d'échec, la midodrine peut être insérée.<sup>41-43</sup> Si celle-ci échoue à son tour, d'autres molécules peuvent être essayées hors Autorisation de Mise sur le Marché, mais donc avec des résultats moins bien démontrés (fludrocortisone, pyridostigmine, etc.).

Enfin, il ne faudra pas négliger la prise en charge de tous les autres symptômes : constipation, dysarthrie, hypersialorrhée...

### b. Anatomopathologie

L'AMS appartient au spectre des maladies neurodégénératives. L'AMS diffère des autres synucléinopathies par la localisation des agrégats protéiques. Les deux éléments clés sont la perte neuronale et les IGC.<sup>44</sup>

L'AMS est caractérisée par les IGC,<sup>45</sup> dont le composant principal est l' $\alpha$ -synucléine, qui se trouvent donc au sein des oligodendrocytes.<sup>46</sup> Au cours de la MPI et de la DCL, les agrégats sont inclus dans le neurone : les Corps de Lewy (CDL). Entre ces deux pathologies, la prédominance de localisation des CDL explique la différence de présentation clinique : substance noire, locus cœruleus, noyau moteur

dorsal du vague et noyau sous-thalamique pour la MPI<sup>47</sup>; et cortex cingulaire, girus parahippocampique et amygdales pour la DCL.<sup>48</sup>

Une récente revue résume bien les principales caractéristiques anatomopathologiques de l'AMS.<sup>44</sup>

La perte neuronale, la gliose, la pâleur myélinique, la dégénérescence axonale sont constantes au cours de l'AMS. Elles peuvent être sévères.

La perte neuronale est le plus sévère dans la substance noire, le putamen (partie dorsolatérale), le vermis, les hémisphères cérébelleux et le noyau olivaire inférieur.<sup>49</sup> De même, la perte neuronale est constante dans le locus coeruleus, le noyau d'Onuf, la colonne intermédiolatérale.<sup>36</sup> La dysautonomie semble être en lien avec la perte neuronale dans les structures du système nerveux autonome - hypothalamus, tronc cérébral, moelle épinière au niveau du noyau d'Onuf et de la colonne intermédiolatérale.<sup>50</sup> Sont beaucoup plus rarement atteints le thalamus, le noyau sous-thalamique, le noyau dentelé, la corne antérieure de la moelle.<sup>36</sup>

L'atteinte de la substance blanche est fréquente et sévère.<sup>45,51,52</sup>

Les IGC sont des structures cytoplasmiques de l'oligodendrocyte ; il s'agit de la caractéristique anatomopathologique de l'AMS.<sup>45</sup> Les analyses en immunohistochimie, aujourd'hui technique de référence pour ce faire,<sup>53</sup> ont montré que le constituant principal de ces structures est l' $\alpha$ -synucléine.<sup>54</sup> Mais ce n'est pas la méthode unique : les IGC étant des agrégats protéiques hautement complexes, il y a de nombreuses autres protéines en leur sein.<sup>55</sup>

Leur taille est comprise entre 5 et 20  $\mu\text{m}$ . Leur morphologie est très variable. En microscopie électronique, on constate que ces IGC sont disposées au hasard dans le cytoplasme, qu'elles sont composées de filaments et de tubules agencés de façon lâche, et recouvertes de matériel dense granulaire.<sup>45</sup> Elles se retrouvent plus volontiers dans les structures pyramidales, extrapyramidales, système nerveux autonome pré-ganglionnaire, cortico-cérébelleuses.<sup>56</sup> Le lien entre perte neuronale et densité en IGC est discuté, avec possiblement des corrélations selon les régions,<sup>49</sup> les IGC étant possiblement pathogéniques à un moment précis du cours de la maladie,<sup>57</sup> alors que Papp et Lantos émettent l'hypothèse qu'il n'y a pas de corrélation entre densité en IGC et sévérité de l'atteinte neuronale dans la plupart des sites étudiés.<sup>56</sup> Les filaments qui composent les IGC, identiques à ceux de la MPI et de la DCL, existent sous deux types de structures différentes<sup>54</sup> : les filaments « entortillés », dont la largeur oscille entre 5 et 18nm et la périodicité est de 70 à 90nm ; et les filaments droits, dont la largeur constante est de 10nm.

Les IGC constituent la caractéristique anatomopathologique principale de l'AMS mais ce ne sont pas les seules inclusions que l'on constate dans cette pathologie : l' $\alpha$ -synucléine peut également s'accumuler dans d'autres types cellulaires ou dans d'autres régions cérébrales, telles que les

inclusions gliales nucléaires,<sup>58</sup> inclusions cytoplasmiques neuronales et inclusions neuronales nucléaires.<sup>59</sup>

La sévérité de l'atteinte des structures cérébrales et sa distribution topographique sont à l'origine des différentes formes cliniques de l'AMS (AMS-P pour une atteinte prédominant sur les structures dopaminergiques, AMS-C pour une atteinte prédominant sur les structures cérébelleuses).<sup>44</sup>

## **c. Rôle physiopathologique de l' $\alpha$ -synucléine**

### **1. Alpha-synucléine en situation normale**

L' $\alpha$ -synucléine est une protéine appartenant au groupe des synucléines qui comprend les  $\alpha$ -synucléines, les  $\beta$ -synucléines, les  $\gamma$ -synucléines. L' $\alpha$ -synucléine est principalement retrouvée dans les neurones, au niveau de la terminaison présynaptique.<sup>60</sup> On les retrouve également au sein des érythrocytes, des plaquettes, des cellules hématopoïétiques, mais aussi au niveau de la jonction neuromusculaire, et des tissus cardiaques.

L' $\alpha$ -synucléine est composée de 140 acides aminés, pour un poids de 140 kilodalton. Sa structure primaire est composée de trois régions :

- La partie N-terminale, amphipatique, comportant une répétition irrégulière de six ou sept fois la séquence lysine-thréonine-lysine-acide glutamique-glycine-valine. Son rôle est encore peu clair mais il semblerait avoir une fonction dans la liaison avec les vésicules synaptiques, et aux membranes.<sup>60</sup>
- La région centrale comprend un motif très hydrophobique [de l'acide aminé 65 à 90 selon certains,<sup>60</sup> 61 à 95 selon d'autres<sup>61</sup>]. Ce motif joue un rôle important dans le repliement en feuillets  $\beta$  et donc dans l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine.<sup>60</sup>
- La partie C-terminale, riche en proline et en acides, a elle aussi un rôle qui n'a pas encore été clairement élucidé. Elle semblerait, de par ses fortes charges négatives, avoir un rôle dans la liaison avec des ions métaux (calcium, fer, cuivre),<sup>61</sup> aux protéines et petites molécules.<sup>60</sup>

A l'état de base, l' $\alpha$ -synucléine semble prédominer sous sa forme monomérique. Cette forme est stable et non repliée. Cependant, les propriétés multifonctionnelles de l' $\alpha$ -synucléine pourraient être dues à sa flexibilité conformationnelle, in vivo essentiellement sous la forme d'hélice  $\alpha$ .<sup>60</sup> La forme oligomérique ne semble pas inévitablement pathologique, de même que d'autres conformations (cf. ci-dessous) ; il existe probablement un équilibre entre différents états conformationnels et oligomériques, sous l'influence de plusieurs facteurs induisant ou modifiant sa structure et son oligomérisation : le stress oxydatif, les modifications post-translationnelles, la protéolyse, la concentration en acides gras, les phospholipides, les ions métaux...<sup>60</sup>

Ses rôles physiologiques ne sont pas encore clairement définis, mais ils pourraient être :

- Le trafic et l'exocytose des vésicules synaptiques, et donc du neurotransmetteur, via plusieurs rôles : elle aide au passage des vésicules du pool de réserve au pool prêt à être relargué, à la constitution du complexe vSNARE-tSNARE et inhibe sa dégradation (complexe important pour l'exocytose des vésicules), elle inhibe le recyclage des vésicules synaptiques qui relarguent le neurotransmetteur, elle aide à la recapture du neurotransmetteur. Elle va aussi réduire le passage des vésicules vers le pool de réserve extra-synaptique. Ceci pourrait notamment être vrai dans le cas de la dopamine puisque l' $\alpha$ -synucléine est capable de se fixer à son récepteur<sup>62</sup> et pourrait donc majorer la recapture de dopamine, ou bien jouer un rôle de régulateur négatif de la neurotransmission dopaminergique, mais glutamatergique également.<sup>63</sup>
- La plasticité synaptique.
- Le rôle de molécule chaperonne et participer au marquage de protéines mal repliées pour les orienter vers le système de dégradation ubiquitine-protéasome.
- La signalisation cellulaire, notamment en interagissant avec les lipides, aussi bien dans la signalisation lipidique que dans leur stockage, leur trafic, la fusion membranaire et la translocation ionique, et aussi comme un récepteur d'endocytose.<sup>61</sup>

Au total, l' $\alpha$ -synucléine semble jouer un rôle important dans le trafic des vésicules synaptiques, et dans la régulation de l'exocytose des vésicules. Néanmoins, le rôle de l' $\alpha$ -synucléine ne semble pas vital car les souris knock-out semblent normales. Ses propriétés sont très importantes en condition de stress, notamment via ses capacités d'adaptation à se fixer aux membranes et aux vésicules.

## **2. Alpha-synucléine en situation pathologique**

Au cours des synucléinopathies, il est maintenant prouvé qu'il existe une accumulation et une redistribution de l' $\alpha$ -synucléine, d'où son possible rôle pathogénique. S'il existe une rupture de l'équilibre synthèse/agrégation/clairance, alors la toxicité pourrait survenir, notamment via les oligomères.

En ce qui concerne une surexpression, une multiplication du gène SNCA entraîne une surexpression de l' $\alpha$ -synucléine, une mutation de SNCA entraîne une majoration de l'agrégabilité,<sup>60</sup> et certains polymorphismes de SNCA entraînent un sur-risque de MPI.<sup>64</sup>

Une des autres hypothèses est la diminution de la clairance par dysfonctionnement des systèmes de dégradation. Il serait possible que lorsque l' $\alpha$ -synucléine devient résistante à la protéolyse (par mutation ou oxydation, notamment par la dopamine), et qu'elle s'associe à d'autres protéines dénaturées, elles submergent le système du protéasome et mènent à la constitution d'agrégats.<sup>61</sup> Mais

sa dégradation pouvant passer par plusieurs voies, possiblement selon son état monomérique ou oligomérique, son accumulation pourrait être due à une addition de dysfonctionnements dans la clairance de l' $\alpha$ -synucléine : dysfonction de la macroautophagie, altération de fonctionnement de l'autophagie médiée par les molécules chaperonnes, mais aussi dysfonction du système ubiquitine/protéasome.<sup>65</sup>

Une des questions principales encore non élucidée pour comprendre le mécanisme physiopathologique menant à une AMS est comment l' $\alpha$ -synucléine, protéine jusqu'ici pensée comme neuronale dans le système nerveux central, est retrouvée au sein des oligodendrocytes dans les IGC. Les données pour répondre à ces questions semblent contradictoires, avec des études ne retrouvant pas d'expression de l' $\alpha$ -synucléine par les oligodendrocytes,<sup>66</sup> ceux-ci captant l' $\alpha$ -synucléine rejetée par les neurones. Cette dernière idée peut être appuyée par une récente expérimentation.<sup>67</sup> L'hypothèse contraire est basée sur une expression de l' $\alpha$ -synucléine par les oligodendrocytes chez des patients AMS et des sujets témoins.<sup>68</sup>

Des modifications post-translationnelles interviennent dans la cascade physiopathologique : phosphorylation anormale de l' $\alpha$ -synucléine, principalement en Sérine (Ser).<sup>61</sup> La phosphorylation en Ser 129 est favorisée par la liaison aux lipides de l' $\alpha$ -synucléine, et cette phosphorylation réduit sa liaison aux lipides.<sup>61</sup> Mollenhauer rappelle également qu'elle est ubiquitinilée sur la lysine (K) en position K12, K21 et K23 et tronquée à sa partie C-terminale et oxydée par la nitration sur la tyrosine et que cette nitration pourrait jouer un rôle dans la fibrillation.<sup>69</sup> Ces modifications post translationnelles pourraient jouer un rôle dans l'initiation et la propagation de la maladie.

L' $\alpha$ -synucléine passe d'une forme monomérique soluble à partiellement repliée puis un noyau fibrillaire et enfin à une forme fibrillaire insoluble mature. La formation de dépôts  $\beta$  amyloïdes semble être cruciale pour ce faire. Cette formation est positivement corrélée à la température, pH-dépendante et concentration-dépendante.<sup>70</sup> La partie N-terminale accélère la formation alors que la partie C-terminale de l' $\alpha$ -synucléine inhibe la formation des feuilletts  $\beta$  plissés ; on retrouve là l'importance de la troncation de la partie C-terminale dans la cascade physiopathologique. Un autre élément important pour la formation de ces repliements anormaux est la séquence des acides aminés 74 à 82 de l' $\alpha$ -synucléine au sein du Non Amyloid Component (NAC), que ne porte pas la  $\beta$ -synucléine et qui est, elle, incapable de réaliser ces repliements.<sup>71,72</sup>

Plusieurs conformations de l' $\alpha$ -synucléine ont été associées à sa pathogénicité : oligomères, protofibrilles, fibrilles... En ce qui concerne la forme fibrillaire, elle est très abondante dans les corps de Lewy, au niveau des corps cellulaires des neurones (MPI, DCL). Cette forme fibrillaire est actuellement vue comme le reflet de la capacité du neurone à isoler et/ou convertir l'oligomère toxique en fibrilles stables, moins dynamiques, moins toxiques. Les formes oligomériques se présentent sous trois tailles : courts oligomères (2 à 5 monomères), bas poids ou moyens (5 à 15) et longs ou haut

poids (15 à 150). On les retrouve essentiellement au niveau des axones et des terminaisons présynaptiques, où ils pourraient léser les dendrites et les synapses. Des études *in vitro* ont permis de montrer qu'il existe plusieurs formes : sphériques, annulaires... Ces différentes formes oligomériques semblent exister en équilibre avec la forme monomérique, et se convertir en fibrilles très lentement.

La forme la plus toxique est aujourd'hui supposée être la forme oligomérique soluble, plus que la forme fibrillaire comme initialement pensé,<sup>73</sup> notamment pour les neurones dopaminergiques.<sup>74</sup> La forme probablement la plus toxique pourrait être l'oligomère court. Cette toxicité pourrait être due à ses propriétés de dégradation des membranes, des mitochondries, une fuite lysosomale, la dégradation des microtubules, et l'interférence avec le transport axonal des protéines synaptiques... La toxicité pourrait donc être liée à plusieurs mécanismes, emprunter différentes voies et intermédiaires sur le chemin de la formation des fibrilles. Il est également supposé que le processus de fabrication des fibrilles lui-même puisse être toxique, plus que les fibrilles en soi ou même que les oligomères. Ainsi, l'oligomérisation et/ou la fibrillation a un rôle central dans la toxicité de l' $\alpha$ -synucléine. La forme monomérique semble moins toxique, mais les études n'utilisent que des formes recombinantes, donc il n'est pas possible d'exclure totalement une participation à la pathogénicité.

La conversion vers une forme oligomérique toxique peut être influencée par des interactions avec les lipides ou des petites molécules, les modifications post-translotionnelles vues précédemment, le stress oxydatif, et la troncation. *In vitro*, plusieurs facteurs favorisent l'auto-assemblage des agrégats riches en feuillets  $\beta$  : augmentation de la concentration, longue incubation, addition d'ions métaux (fer, cuivre, zinc), nitration, ligands (dont la dopamine).

Le repliement et l'agrégation des protéines dans les maladies neurodégénératives semblant de plus en plus en lien avec la physiopathologie, il faut ensuite expliquer la progression des anomalies anatomopathologiques, elle-même expliquant la progression clinique de la maladie. En ce qui concerne la maladie de Parkinson, la théorie de Braak<sup>75,76</sup> émet l'hypothèse que les agrégats d' $\alpha$ -synucléine se propagent de proche en proche, à partir du locus cœruleus et du noyau moteur dorsal du vague, jusqu'à une atteinte plus diffuse du système nerveux central. Actuellement, il est émise l'hypothèse que cette propagation pourrait se faire sur un mode approchant le mécanisme de la protéine prion.<sup>77-79</sup> Des données laissent à penser que l' $\alpha$ -synucléine peut être excrétée, aussi bien sous forme monomérique que d'agrégats<sup>80</sup>; l'hypothèse d'une exocytose de l' $\alpha$ -synucléine est soutenue par le fait qu'on la retrouve dans le LCR et le plasma, à la fois chez les patients atteints de MPI et des sujets témoins.<sup>81,82</sup> Ce passage dans le milieu extra cellulaire pourrait amener à un transfert inter neuronal ou de neurones à cellules gliales ou de cellules gliales à cellules gliales, et donc induisant une agrégation à distance et/ou déclenchant un processus inflammatoire qui exacerbe le processus dégénératif.<sup>60</sup> Le passage d'extra en intracellulaire pourrait se faire soit par endocytose, soit par pénétration directe, soit par dissémination transsynaptique, ou même il pourrait exister un récepteur

membranaire.<sup>60</sup> Ceci aboutit à la phase de nucléation, induisant la formation d'un oligomère, puis à la croissance de l'oligomère et formation de fibrilles via l'addition de monomères. Ce processus pourrait être accéléré ou initié par des fibrilles préformées dans la cellule cible.<sup>60</sup>

### **3. Différences physiopathologiques entre AMS et MPI/DCL**

L'essentiel des connaissances de l' $\alpha$ -synucléine est issu d'études portant sur la MPI. Cependant, il n'est pas à exclure la possibilité de différences de mécanismes physiopathologiques entre ces maladies. Ainsi, les agrégats d' $\alpha$ -synucléine sont plus épais au sein des IGC que des CDL.<sup>58</sup> De même, les CDL contiennent des protéines du neurofilament, pas les IGC. Les IGC contiennent d'autres protéines :  $\alpha\beta$ -crystalline,  $\alpha$  et  $\beta$  tubuline... L' $\alpha$ -synucléine est tronquée dans les IGC, ce qui pourrait influencer l'architecture des IGC.<sup>83</sup>

La p25 $\alpha$  est également une protéine entrant dans la composition des IGC.<sup>84</sup> Elle assure pour rôles physiologiques la stabilisation des microtubules, des structures ciliaires ainsi que des projections des oligodendrocytes,<sup>85</sup> et intervient dans la différenciation des oligodendrocytes.<sup>86</sup> Au cours de l'AMS, la p25 $\alpha$  est redistribuée de la myéline vers le corps cellulaire des oligodendrocytes qui est augmenté de volume lorsqu'il contient des IGC ; redistribution qui est associée à une diminution en Myelin Binding Protein (MBP) normale (qui se lie avec la p25 $\alpha$  avec une grande affinité) et une MBP anormale en plus grande quantité.<sup>51</sup> La p25 $\alpha$  semblerait jouer un rôle dans la formation des inclusions et la mort des oligodendrocytes via une facilitation de l'oligomérisation de l' $\alpha$ -synucléine,<sup>87</sup> mais aussi par destruction des microtubules du cytosquelette.<sup>88</sup> La p25 $\alpha$  semble être une piste intéressante dans la compréhension du mécanisme menant à la constitution des agrégats d' $\alpha$ -synucléine également car elle n'est pas retrouvée dans les tauopathies, et semble donc spécifique aux synucléinopathies.<sup>84</sup>

### **4. Hypothèse physiopathologique et autres dysfonctionnements cellulaires**

La piste privilégiée actuellement est celle d'une oligodendrocytopathie. En conditions normales, les oligodendrocytes mûrent et myélinisent les axones. La microglie est quiescente et ramifiée. P25 $\alpha$  est impliquée dans la myélinisation, l' $\alpha$ -synucléine est dans les terminaisons nerveuses. Les tout premiers stades de la maladie ne sont pas bien connus, mais il existe vraisemblablement une surexpression de l' $\alpha$ -synucléine et/ou une redistribution.

Il se pourrait également que de façon précoce survienne une dysrégulation de la MBP conduisant à une dysfonction dans l'interaction p25 $\alpha$  – MBP, conduisant à une dégradation de la myéline, menant à une relocalisation somatique de la p25 $\alpha$ . Cette relocalisation entraîne une dysfonction de la myéline et une augmentation de taille du corps cellulaire de l'oligodendrocyte. Dans le corps cellulaire, la p25 $\alpha$  faciliterait l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine, entraînant une dysfonction des oligodendrocytes qui mènerait à la mort neuronale. Parallèlement, l' $\alpha$ -synucléine forme des oligomères puis des fibrilles

menant aux IGC, processus favorisé par la redistribution dans le corps cellulaire de la p25 $\alpha$ . Les IGC mènent à la mort oligodendrocytaire, mort cellulaire activant la neuro inflammation, et au relargage d' $\alpha$ -synucléine agrégée dans l'espace extra cellulaire, qui peut être recaptée par les neurones environnants, ce qui mène à la formation des inclusions neuronales et ainsi à la propagation de la maladie.

L' $\alpha$ -synucléine et le processus dégénératif activent la microglie, tout comme la perte myélinique expose les axones aux effets de l'inflammation.<sup>89</sup> En effet, les modèles animaux de l'AMS retrouvent quasi-constamment une activation importante de la microglie,<sup>90</sup> et cet effet semble être un événement précoce dans la cascade menant à la dégénérescence neuronale,<sup>89</sup> d'autant plus que l' $\alpha$ -synucléine elle-même active la microglie.<sup>91,92</sup> L' $\alpha$ -synucléine est aussi responsable d'une dysfonction mitochondriale<sup>93</sup> menant à une majoration de la mitophagie.<sup>65</sup> Le stress oxydant et un trouble du métabolisme du fer semblent aussi participer à la physiopathologie de l' $\alpha$ -synucléine.<sup>61</sup> De même, un excès de nitration de la tyrosine a été retrouvé dans l' $\alpha$ -synucléine des CDL et des IGC, conduisant à sa fibrillation et son agrégation.<sup>94</sup>



## **II- Intérêts d'un biomarqueur**

La définition du National Institute of Health d'un biomarqueur est qu'il s'agit d'« une caractéristique mesurée objectivement et évaluée comme indicateur de processus physiologique ou pathologique, ou de l'action des médicaments ». Il peut être biologique, radiologique, etc.

### **a. Intérêt diagnostique**

Un marqueur biologique permettrait un diagnostic précis de la maladie. En effet, en pratique clinique, malgré l'expertise des spécialistes, le tableau clinique initial d'un patient souffrant d'une AMS peut parfois être très trompeur, eu égard à sa ressemblance avec la MPI dans sa forme AMS-P, un syndrome cérébelleux sporadique du sujet âgé dans sa forme AMS-C. De même, les examens complémentaires qui sont théoriquement d'une aide importante au diagnostic (EMG périnéal, IRM cérébrale, etc.) ne sont que peu sensibles et spécifiques et/ou que peu accessibles en pratique quotidienne, ou peu informatifs, ou bien encore informatifs à un stade trop tardif dans l'évolution de la maladie. Il existe un grand nombre de cas où seule l'évolution peut orienter vers le diagnostic.

Il pourrait permettre une amélioration de la sensibilité et de la spécificité du diagnostic dès les stades précoces de la maladie, notamment pour le différencier des autres synucléinopathies, afin de mieux informer et de mieux accompagner le patient et son entourage.

### **b. Intérêt pronostique**

Si celui-ci était évolutif au fur et à mesure du cours de la maladie, il pourrait avoir un intérêt pronostic, afin de déterminer à quel stade d'évolution se situe le patient. Là encore, la question de l'information claire apportée au patient est importante.

### **c. Intérêt thérapeutique et de recherche**

Un diagnostic plus précoce et plus précis permettrait en outre de développer des stratégies neuroprotectrices, notamment la recherche d'un médicament permettant de ralentir ou de stopper l'évolution de la neurodégénérescence. On imagine aisément qu'une thérapie visant à agir le plus précocement possible sur le processus dégénératif a d'autant plus de chances d'être efficace que ce processus est le moins avancé.

Enfin, s'il est quantitatif et reflet de la sévérité de la pathologie, il permettrait d'évaluer objectivement l'efficacité des thérapies neuroprotectrices. Les échelles, qui sont certes validées et reconnues, sont

toujours soumises à une part de variabilité inter et intra-individuelles, ainsi qu'examineur-dépendantes.

#### **d. Intérêt d'un biomarqueur de l'AMS en particulier**

Rechercher un biomarqueur constituant le reflet de la physiopathologie et de la progression de l'AMS nous semble d'autant plus utile que celle-ci pourrait être le prototype idéal pour servir de modèle de synucléinopathie dans la recherche d'un traitement modifiant le cours évolutif : rapidité d'évolution et pronostic sombre sont autant d'arguments qui plaident en faveur de l'AMS plutôt que la MPI au moment de choisir des candidats pour tester un médicament modifiant le cours évolutif.<sup>95</sup> Les dernières estimations évaluent à 78 le nombre de sujets nécessaires pour montrer une différence de 30% de l'UMSARS entre le groupe traité et le groupe non traité,<sup>95</sup> ce qui semble envisageable notamment à la vue des 400 patients recrutés pour un essai thérapeutique récent.<sup>96</sup>

#### **e. Critères de qualité d'un biomarqueur**

Un marqueur biologique doit répondre à un certain nombre de critères de qualité. Le biomarqueur idéal aurait le profil suivant<sup>97</sup> :

- Fiable, précis : capacité à mesurer ce qu'on lui demande de mesurer.
- Reproductible : plusieurs mesures doivent donner des réponses identiques.
- Sensible (> 80%) : capacité à classer les malades, pourcentage de tests positifs parmi les malades.
- Spécifique (>80%) : capacité à classer les non-malades, pourcentage de tests négatifs parmi les non-malades.
- Provenant d'un prélèvement non ou peu invasif : afin d'être utilisé en pratique courante, afin d'être acceptable et accepté par les patients.
- Induisant peu d'évènements indésirables : le bénéfice du recueil de ce biomarqueur ne doit pas être inférieur aux risques encourus par le patient.
- En relation avec la lésion pathologique et de sa physiopathologie.
- Simplicité de la réalisation et peu coûteux. Applicable à grande échelle.
- Démonstré dans au moins deux études différentes et indépendantes.

Pour permettre de prouver un effet de modulation de la neurodégénérescence à une phase préclinique, il faudrait qu'il identifie de façon suffisamment spécifique les patients à une phase pré symptomatique, mais aussi qu'il soit un bon reflet de cette neurodégénérescence aussi précocement.

### **III- Objectifs et méthodologie de la recherche**

#### **a. Objectifs**

L'objectif de ce travail était d'établir une revue de la littérature concernant la recherche d'un marqueur biologique de l'AMS dans le cadre du protocole BIOAMS qui vise à comparer l' $\alpha$ -synucléine totale et oligomérique chez les patients AMS par rapport aux sujets sains. L'inclusion des témoins appariés en âge et en sexe aux cas n'a pas pu être terminée à temps. Les dosages biologiques n'ayant donc pas pu être réalisés, nous ne présenterons ci-dessous (cf. partie V) que le protocole établi et les données cliniques des cas recrutés.

#### **b. Méthodes**

La méthodologie précise du protocole BIOAMS sera revue dans la partie consacrée (cf. V-c).

Concernant la revue de la littérature, une recherche PUBMED a été réalisée jusqu'au 5 août 2014, avec les mots clés suivants : ("*multiple system atrophy*" OR *MSA* OR "*olivopontocerebellar atrophy*" OR *OPCA* OR "*striatonigral degeneration*" OR *SND* OR "*Shy Drager Syndrome*") AND (*blood* OR *plasma* OR "*cerebrospinal fluid*" OR *CSF*). Seuls les articles en anglais ont été retenus. Tout article jugé d'intérêt par ailleurs pouvait être inclus manuellement. Ont été exclus ceux portant sur les tests hormonaux. Une attention toute particulière a été portée sur ceux traitant de l' $\alpha$ -synucléine.

## IV- Candidats biomarqueurs de l'AMS : revue de la littérature

### a. Alpha-synucléine

L' $\alpha$ -synucléine ayant un rôle physiopathologique majeur et constituant une caractéristique anatomopathologique fondamentale de l'AMS, son dosage paraît être un bon candidat biomarqueur. Contrairement à ce qui pouvait être initialement pensé,<sup>98</sup> il est possible de doser l' $\alpha$ -synucléine dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), mais aussi dans d'autres liquides biologiques.

#### 1. Dans le LCR

Le LCR étant au contact direct du système nerveux central, il fait l'objet de la majorité des recherches en cours sur le sujet. Vingt pour cent des protéines du LCR sont issues du système nerveux central (80% des protéines sont plasmatiques).

L' $\alpha$ -synucléine peut se doser sous plusieurs de ses formes : totale (cf. tableau 1), ou ses formes phosphorylées, oligomériques, etc. (cf. tableau 2).

#### Alpha-synucléine totale

L' $\alpha$ -synucléine totale chez les patients porteurs d'une AMS a été étudiée principalement dans 9 études.

Chez des sujets vivants, les résultats sont dans leur majorité concordants : les études retrouvent une  $\alpha$ -synucléine abaissée chez les AMS par rapport aux sujets contrôles et aux porteurs d'une Démence de Type Alzheimer (DTA).<sup>99-104</sup> Il n'y a pas d'exception pour contredire que le taux ne diffère pas entre AMS et MPI,<sup>99-104</sup> ou bien entre AMS-P et AMS-C.<sup>105</sup> Il n'y a pas non plus de différence entre AMS et DCL.<sup>100</sup> Une étude retrouve un taux abaissé chez les MPI et AMS en comparaison des PSP et DCB.<sup>104</sup> Trois études ne trouvaient pas de différence entre AMS et contrôles : la première<sup>101</sup> présentait un échantillon de très petite taille pour les AMS et donc la puissance a pu faire défaut, celle-ci étant conçue pour étudier les trois synucléinopathies en comparaison de la DTA ; les deux autres études<sup>105,106</sup> partageaient les témoins, et nous pouvons nous demander si elles ne partageaient pas également des sujets AMS car non seulement ceux-ci sont issus de la même période de recrutement au sein d'une seule équipe de recherche, mais aussi les taux retrouvés étaient quasiment similaires (25,0 ng/ml pour la première, et 26,3 ng/ml pour la seconde). Ces résultats sont donc difficilement généralisables en l'état, et il paraît difficile de considérer ces deux études de manière complètement distincte. La différence de ces résultats par rapport au reste de la littérature pourrait aussi s'expliquer par la différence de technique de dosage, puisqu'une autre étude, utilisant la même technique qu'Hall,<sup>100</sup> a retrouvé un taux similaire entre synucléinopathies au sens large (mais seulement 7 patients AMS) et témoins.<sup>107</sup>

Sur du LCR post mortem, Foulds et collaborateurs ont réalisé un dosage de l' $\alpha$ -synucléine dans le LCR prélevé au niveau ventriculaire ou sous-arachnoïdien de sujets atteints d'AMS (n=8), de MPI, de DCL et de PSP. L' $\alpha$ -synucléine n'était pas augmentée ni diminuée dans le groupe des synucléinopathies par rapport aux sujets contrôles, ni même entre les différentes synucléinopathies.<sup>108</sup> On peut néanmoins s'interroger sur la différence majeure de taux retrouvée dans cette étude par rapport à celles précédemment citées, et nous tenterons d'expliquer ces différences ci-dessous (cf. partie IV-a.3. Méthodes de dosage).

Concernant une éventuelle corrélation avec la sévérité de la maladie ou de la durée d'évolution, il n'y a pas d'arguments pour le penser aux travers de ces différentes études.<sup>99,100,104</sup> Une étude a trouvé une corrélation entre âge et taux d' $\alpha$ -synucléine mais pas avec le degré de sévérité de la maladie évalué par le score Hoehn-Yahr,<sup>100</sup> alors qu'une autre étude retrouvait une corrélation entre la sévérité (Stade Hoehn et Yahr) chez les AMS mais pas les MPI ni autres syndromes parkinsoniens atypiques.<sup>105</sup> Néanmoins, les données cliniques disponibles dans ces études sont limitées, le plus souvent à la partie motrice de l'UMSARS ou bien le stade Hoehn et Yahr. Manquent les parties non motrices de l'UMSARS, la dysautonomie, l'anxiété, ou bien encore les symptômes dépressifs. Nous verrons plus loin que le protocole BIOAMS tentera de répondre à cette problématique.

**Tableau 1 Alpha-synucléine totale dans le LCR**

Etudes	Technique de dosage	Effectif des sujets AMS (n=)	Taux (ng/ml)	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI	AMS vs. SPKA	AMS vs. DTA	AMS-P vs. AMS-C
Mollenhauer et al., 2011 <sup>99</sup>	ELISA (1° et 2° génération)	29	1,24 (0,69 à 6,18)	Diminué	Pas de différence		Diminué	Pas de différence
		15	1,11 (0,23-2,00)	Diminué	Pas de différence		Diminué	
Wang et al., 2012 <sup>102</sup>	BBMA	16	0,33±0,12	Diminué	Pas de différence	Pas de différence*	Pas de différence	Pas de différence
		25	0,319±0,119	Diminué	Pas de différence	Pas de différence*	Diminué	
Shi et al., 2011 <sup>103</sup>	BBMA	32 (>50ans + Hb < 200 µg/l = 20)	0,3± 0,09	Diminué	Pas de différence		Diminué	
Tateno et al., 2012 <sup>101</sup>	ELISA	11	0,108 ± 0,069	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence***	Diminué	
Hall et al., 2012 <sup>100</sup>	BBMA	48	56 (43-66)	Diminué	Pas de différence	Diminué *		
Aerts et al., 2012 <sup>105</sup>	ELISA	47 (probable = 20)	25,0 (17-32)	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence		
Herbert et al., 2014 <sup>106</sup>	ELISA	23 (AMS+Hb<0,1µg/l = 18)	26,3 ± 8,1	Pas de différence	Pas de différence			
Mondello et al., 2014 <sup>104</sup>	ELISA	34	0,75 (0,69-1,01)	Diminué	Pas de différence	Diminué **		Pas de différence
Foulds et al., 2012 <sup>108</sup>	ELISA	8	3800 ± 2400	Pas de différence	Pas de différence			

**NB : \*AMS vs. PSP ; \*\*AMS+MPI vs. PSP+DCB ; \*\*\*AMS vs. DCL. BBMA = Bead-based multianalyte assay. AMS = Atrophie multisystématisée (AMS-P = AMS forme parkinsonienne ; AMS-C = AMS forme cérébelleuse). DCL = Démence à Corps de Lewy. DTA = Démence de Type Alzheimer. ELISA = méthode immunoenzymatique sur support solide. Hb = hémoglobine. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique. PSP = Paralyse Supranucléaire Progressive. SPKA = Syndromes Parkinsoniens Atypiques.**

### Ratio $\alpha$ -synucléine totale / protéinorachie

Par ailleurs, on pourrait se poser la question de savoir si le rapport  $\alpha$ -synucléine/protéines totales du LCR ne pouvait être modifié chez les patients : soit en raison d'une possible augmentation de la proportion de synthèse d' $\alpha$ -synucléine par rapport aux autres protéines, soit à une diminution du rapport par séquestration spécifique de l' $\alpha$ -synucléine dans les IGC. S'il peut être différent chez les synucléinopathies des contrôles, il ne diffère pas entre AMS et MPI.<sup>99</sup> Ce rapport n'a néanmoins que très peu été étudié.

### Forme phosphorylée de l' $\alpha$ -synucléine

L' $\alpha$ -synucléine totale n'ayant pas permis l'identification claire d'un potentiel de biomarqueur à elle-seule, et à la vue de la physiopathologie des IGC et autres CDL, il a été émis l'hypothèse que la forme phosphorylée de l' $\alpha$ -synucléine pourrait être plus pertinente dans la différenciation de l'AMS des autres synucléinopathies et syndromes parkinsoniens. En 2012, Wang et collaborateurs ont donc mené cette étude.<sup>102</sup> Pour ce faire, et même si la spectroscopie de masse permettait de détecter l' $\alpha$ -synucléine phosphorylée en position sérine 129 (PS-129), ils ont développé une technologie de profilage multi-analytes basée sur des perles (Bead-based Multianalyte Assay (BBMA) = Luminex®), technique plus robuste et plus pratique. Après avoir déterminé le seuil de positivité (0,009 ng/ml), le taux moyen chez cinq sujets sains ( $0,0816 \pm 0,0204$  ng/ml), ils ont démontré que la PS-129 ne pouvait pas être détectée avec Luminex® dans le sang et donc que le dosage dans le LCR ne serait pas artéfacté par une éventuelle contamination sanguine. Par ailleurs, ils ont aussi montré que la PS-129 n'était pas associée au sexe, qu'une relation âge-dépendante semble exister, sauf si l'on exclut les sujets de moins de 50 ans qu'ils ont donc sortis de leur analyse. La première cohorte retrouvait un taux de PS-129 plus bas chez les AMS que chez les MPI. La cohorte de validation a permis de répliquer ce résultat. La PS129 a également été dosée dans l'étude de Foulds et collaborateurs,<sup>108</sup> et à l'inverse de la première étude, celle-ci n'a pas montré de différence significative entre AMS et autres synucléinopathies, ni même entre synucléinopathies et contrôles. Cette étude avançait l'hypothèse que la PS-129 était la principale forme d' $\alpha$ -synucléine dans le LCR, hypothèse à vérifier au cours de prochaines études.

### Ratio forme phosphorylée de l' $\alpha$ -synucléine / $\alpha$ -synucléine totale

Le rapport PS-129/ $\alpha$ -synucléine totale permettait dans la première cohorte de Wang et collaborateurs<sup>102</sup> la différenciation des AMS et des PSP, des AMS des contrôles mais pas les AMS des MPI; ceci n'a pu être répliqué dans la cohorte de validation hormis le fait que le rapport PS-129/ $\alpha$ -synucléine totale était augmenté de manière similaire chez les AMS et les MPI. Il serait donc d'autant plus utile de rééditer ces dosages sur une autre grande étude afin de déterminer si la significativité statistique entre AMS et PSP ou contrôles n'est due qu'à une inflation du risque de première espèce liée à la multiplication des comparaisons, ou bien à une vraie différence de taux entre ces catégories de sujets. Toujours dans la même étude, les courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) ont permis d'étudier les capacités diagnostiques de ces dosages. Il a été déterminé que l'association  $\alpha$ -synucléine

totale + PS-129 était plus précise que la PS-129 seule, et encore plus que l' $\alpha$ -synucléine totale seule ; ces éléments sont repris dans la partie traitant de la combinaison de biomarqueurs (VI-c).

#### Fraction oligomérique de l' $\alpha$ -synucléine

Seule l'étude portant sur des sujets avec confirmation anatomopathologique des diagnostics<sup>108</sup> a étudié l' $\alpha$ -synucléine oligomérique et retrouvait un taux similaire entre les différents groupes. Le nombre de patients étant très limité (8 sujets AMS), et les taux des autres formes d' $\alpha$ -synucléine très différents des autres études menant à douter des résultats, la généralisation de celui-ci n'est pas possible.

#### Forme oligomérique et phosphorylée de l' $\alpha$ -synucléine

Cette étude a permis de démontrer une différence pour une seule molécule : l' $\alpha$ -synucléine oligomérique et phosphorylée en Ser129 (oligo-PS-129). Celle-ci distinguait nettement les AMS, MPI, DCL, PSP des sujets contrôles, mais également les AMS des autres synucléinopathies et de la PSP, par son taux qui y était plus élevé. Celui-ci n'était pas corrélé à l'âge de début, à la durée d'évolution de la maladie ; y compris lorsque l'on associait  $\alpha$ -synucléine oligomérique et oligo-PS-129 et  $\alpha$ -synucléine totale ou oligomérique ou PS-129. L'un des points forts de cette étude était bien sûr la certitude diagnostique puisqu'anatomopathologique, ce qui est rarement le cas dans les études sus-citées. En revanche, une des limites possibles est le délai post-mortem jusqu'au prélèvement, même si d'après les auteurs, ce délai ne semble pas être responsable d'un biais important puisque les résultats étaient les mêmes après ajustement sur ce délai décès-prélèvement. Ce taux si massivement augmenté par rapport aux autres études pourrait être expliqué par l'arrêt de fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) post mortem, permettant ainsi une diffusion de l' $\alpha$ -synucléine de la périphérie vers le LCR ; cette hypothèse nous paraissant la plus probable est à pondérer par le fait que le taux d' $\alpha$ -synucléine dans le LCR n'a pas été retrouvé corrélé au gradient LCR/sang de l'albumine, classiquement considéré comme le reflet du fonctionnement de la BHE.<sup>109</sup> La grande différence du taux d' $\alpha$ -synucléine totale entre l'étude de Foulds et les autres amène à fortement douter de la possibilité de généraliser ces résultats et demande confirmation. Pour ce qui est de la contamination par les globules rouges, la technique utilisée permettrait d'après les auteurs de contourner ce biais potentiel ; pour ce qui est des plaquettes, l' $\alpha$ -synucléine ne serait pas phosphorylée et donc non dosée par leur technique.



**Tableau 2 Autres formes d' $\alpha$ -synucléine dans le LCR**

Biomarqueurs	Études	Effectif des sujets AMS (n=)	Technique de dosage	Taux (en ng/ml)	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI	AMS vs. SPKA
PS-129	Wang et al., 2012 <sup>102</sup>	16	BBMA	0,05812 ± 0,02024	Diminué	Diminué	Pas de différence*
		25		0,06197 ± 0,01419	Diminué	Diminué	Pas de différence*
	Foulds et al., 2012 <sup>108</sup>	8	ELISA	7140 ± 9190	Pas de différence	Pas de différence	
PS-129/ $\alpha$ -synucléine totale	Wang et al., 2012 <sup>102</sup>	16	BBMA	0,24 ± 0,12	Augmenté	Pas de différence	Augmenté*
		25		0,22 ± 0,08	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence
$\alpha$ -synucléine oligomérique	Foulds et al., 2012 <sup>108</sup>	8	ELISA	22490 ± 190	Pas de différence	Pas de différence	
Oligo-PS-129	Foulds et al., 2012 <sup>108</sup>	8	ELISA	19560 ± 1660	Augmenté	Augmenté	

**NB:** \*AMS vs. PSP. AMS = Atrophie multisystématisée. BBMA = Bead-based multianalyte assay. ELISA = méthode immunoenzymatique sur support solide. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique. Oligo-PS-129 =  $\alpha$ -synucléine oligomérique phosphorylée en sérine 129. PSP = Paralyse Supranucléaire Progressive. PS-129=  $\alpha$ -synucléine phosphorylée en sérine 129. SPKA = Syndromes Parkinsoniens Atypiques.

## 2. Dans le sang

Les études recherchant l'alpha-synucléine dans le sang remontent à quelques années avant celles l'étudiant dans le LCR. La quasi-totalité (99%) de l'alpha-synucléine dosée dans le sang proviendrait des globules rouges, le reste proviendrait des plaquettes, des cellules mononuclées ou du plasma.<sup>110</sup>

Dès 2006, il était suggéré que l'alpha-synucléine totale était plus élevée non seulement chez les AMS que les sujets contrôles, mais aussi que cette augmentation était inférieure chez les AMS que chez les MPI et que l'on pourrait donc différencier ces deux pathologies par cette analyse.<sup>111</sup> Plus récemment, l'élévation du taux d'alpha-synucléine dans le plasma par rapport aux contrôles a été confirmée, mais sans comparaison à des sujets MPI, et sans différence retrouvée entre AMS-P et AMS-C.<sup>112</sup> Ce résultat n'est pas concordant avec la troisième étude, qui ne retrouve pas d'augmentation de l'alpha-synucléine ou de son rapport sur la protidémie chez les patients AMS.<sup>99</sup> Ceci est résumé dans le tableau 3. Il n'a pas été démontré de corrélation entre le taux plasmatique et la durée d'évolution ou la sévérité de la maladie.<sup>111,112</sup> Là encore, la variabilité inter-études est importante : alors que Lee retrouvait un taux à 0,0781 +/- 0,0035 ng/ml,<sup>111</sup> Mollenhauer retrouvait un taux bien supérieur : 10,47 (4,43-18,98) ng/ml. La reproductibilité étant si médiocre, les résultats et donc leur généralisation s'en trouvent très affectés.

Bien que la PS-129 soit dosable dans le LCR par la technique Luminex®, ceci n'a pas pu être fait dans le sérum avec cette technique.

**Tableau 3 Alpha-synucléine totale plasmatique**

Etudes	Effectif des AMS (n=)	Technique de dosage	Taux en ng/ml	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI	AMS-P vs. AMS-C
Lee et al., 2006 <sup>111</sup>	38	ELISA	0,078.1 +/- 0,003.5	Augmenté	Diminué	
Mollenhauer et al., 2011 <sup>99</sup>	15	ELISA	10,470 (4,43-18,98)	Pas de différence	Pas de différence	
Sun et al., 2014 <sup>112</sup>	74 (AMS-P = 30; AMS-C= 44) Possible = 26 Probable = 48	ELISA	11,080 (7,110–21,210)	Augmenté		Pas de différence

**NB : AMS = Atrophie Multisystématisée (AMS-P = AMS forme parkinsonienne ; AMS-C = AMS forme cérébelleuse). ELISA = méthode immunoenzymatique sur support solide.**

### 3. Méthodes de dosage

Le développement d'un biomarqueur nécessite de prendre en compte la technique de dosage utilisée. En effet, il est nécessaire que celle-ci soit précise, fiable, reproductible ; et qu'elle soit capable d'être utilisée à grande échelle, donc d'autant plus simple et rapide. Aujourd'hui plus encore qu'hier, il est également nécessaire de prendre en compte le paramètre « coût » du dosage.

Si en anatomopathologie les colorations usuelles (et donc simples d'utilisation) peuvent colorer les IGC (hématoxyline-éosine), ainsi que les feuillettes  $\beta$ -amyloïdes (coloration au rouge Congo des dépôts, thioflavine), les techniques d'immunomarquage sont bien plus sensibles et spécifiques. Les anticorps sont dirigés contre l' $\alpha$ -synucléine essentiellement (voire l'ubiquitine) et constituent la technique de référence pour détecter ces lésions. Les anticorps fixant les IGC fixent principalement la partie en C-terminal (Murray, 2001). Lorsqu'il s'agit de réaliser un dosage de l' $\alpha$ -synucléine dans un tissu biologique de type sang ou LCR, la méthode la plus utilisée actuellement pour la majorité des études est celle de la méthode immunoenzymatique sur support solide, appelée en anglais ELISA (pour Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Des auteurs s'attachent à améliorer la précision des techniques ELISA,<sup>113</sup> l'objectif étant de parvenir à une sensibilité et une spécificité les meilleures possibles, des nouvelles techniques et notamment des nouveaux anticorps.<sup>114</sup> Un des écueils majeurs actuels est la reproductibilité du dosage de l' $\alpha$ -synucléine : les différentes études ont souvent utilisé des techniques ELISA différentes pour le dosage de l' $\alpha$ -synucléine, avec notamment des anticorps différents aussi bien pour la capture que la détection. Une étude a étudié la reproductibilité test/re-test, trouvant une reproductibilité supérieure à 90%,<sup>115</sup> mais avec une seule méthode au sein d'une même équipe.

Une des limites actuelles à l'extension des résultats des études vues ci-dessus à plus grande échelle est la grande variabilité de taux entre les équipes de recherche. Plusieurs éléments doivent être discutés pour essayer d'expliquer cette variabilité. La méthode de recueil (ponction lombaire, entre les 3èmes et 4èmes vertèbres lombaires ou entre les 4èmes et 5èmes) ne diffère pas ou peu, seul Foulds et associés ont procédé au recueil sur des patients post mortem, le LCR provenant des espaces sous-arachnoïdiens ou ponction ventriculaires ; il semble néanmoins peu plausible que seul le gradient rostro-caudal puisse expliquer un taux si différent des autres études, et que cette différence soit plus probablement en lien avec le délai post-mortem inhérent au recueil de ce type. L'ensemble des équipes utilise des tubes en polypropylène. Les études qui le précisent montrent que la centrifugation a également été faite rapidement après prélèvement, le stockage a dans l'ensemble été fait à -80°C. La principale source de variabilité pourrait provenir des anticorps utilisés : selon les études, les anticorps utilisés diffèrent, donc des sites de reconnaissance différents, et donc la possibilité que leurs performances soient différentes et ainsi faire varier les résultats. Une étude est en cours pour évaluer la reproductibilité inter-centres d'un dosage de l' $\alpha$ -synucléine chez les sujets atteints de MPI, comportant

18 centres, dans le cadre du projet EU-BIOMARKPD.<sup>116</sup> A la vue des différences de taux constatées entre les différentes études, la reproductibilité inter-centres paraît en effet être un des éléments prioritaires à mener pour l'étude de l' $\alpha$ -synucléine dans le LCR des synucléinopathies au sens large.

Le développement de nouvelles techniques de dosage est également une piste intéressante. Il existe plusieurs pistes :

- Une amélioration de la technique ELISA permettrait d'améliorer les performances diagnostiques concernant le dosage de la forme oligomérique, forme pensée être la plus toxique pour les neurones. Elle se déroule en deux étapes : la première consiste à différencier les formes fibrillaires des formes oligomériques et monomériques, au moyen d'un anticorps qui ne reconnaît que la partie terminale de l' $\alpha$ -synucléine, de l'acide aminé Gly111 à Ala140. Les auteurs disent avoir démontré que cette séquence n'était présentée que par les formes oligomériques, et donc que les formes fibrillaires n'étaient par reconnues par des anticorps ciblant cette séquence, les anticorps ASyO2 et ASyO5, liant respectivement les séquences Glu131-Ala140 et Gly111-Tyr125. Ils utilisent par la suite ces anticorps, en association avec une propriété pharmacocinétique qu'est l'avidité - définie comme une augmentation synergique de la force de la liaison quand un récepteur multivalent se lie à un antigène multivalent. Cette technique en deux étapes permettrait de déterminer de manière précise et fiable la concentration en forme oligomérique, excluant les formes fibrillaires et monomériques. Ils ont par là même pu reproduire les résultats montrant une augmentation de la concentration de l' $\alpha$ -synucléine oligomérique chez les MPI par rapport aux contrôles.<sup>117</sup>
- Une nouvelle technique semble voir le jour : l'utilisation du principe de la fluorescence par résonance du transfert d'énergie (Fluorescence Resonance Energy Transfer = FRET), pour une technique appelée le TR-FRET pour « Time Resolved Förster's Resonance Energy Transfer ». Bien que cette technique soit en pleine expansion dans d'autres domaines, elle n'en est qu'à ses balbutiements dans celui qui nous intéresse mais semble prometteuse pour ce qui est de l' $\alpha$ -synucléine car *a priori* sensible, spécifique, reproductible ; elle a reproduit les résultats attendus chez les sujets MPI en comparaison des contrôles pour l' $\alpha$ -synucléine totale. Son avantage principal est sa simplicité (moins de manipulations qu'une technique ELISA) et semblerait utilisable pour des analyses en grande quantité.<sup>118</sup> Il n'existe à ce jour pas d'étude l'ayant appliquée sur des sujets AMS.

## **b. Autres candidats biomarqueurs**

### **1. En lien avec la physiopathologie**

#### *a) Peptide précurseur de l'amyloïde et dérivés*

Le peptide précurseur de l'amyloïde (en anglais Amyloid Precursor Protein = APP) est une protéine transmembranaire dont la fonction reste mal connue. Il peut être clivé par différentes formes d'une même enzyme ; ainsi, l' $\alpha$ -sécrétase va entraîner la formation de facteurs de transcription, le « soluble  $\alpha$  cleaved fragments of amyloid precursor protein » (sAPP $\alpha$ ) et C83. S'il s'agit d'une  $\beta$ -sécrétase, cela va entraîner la formation de deux peptides : le « soluble  $\beta$  cleaved fragments of amyloid precursor protein » (sAPP $\beta$ ) et le C99. Le sAPP $\beta$  va ensuite lui-même être clivé par les  $\gamma$ -sécrétases pour donner naissance au peptide amyloïde : A- $\beta$ . Ce peptide A- $\beta$  peut être constitué essentiellement soit de 42 acides aminés (A- $\beta$ 42) soit de 40 acides aminés (A- $\beta$ 40) ; il existe d'autres formes plus courtes en C-terminal : A- $\beta$ 37, A- $\beta$ 38, A- $\beta$ 39. Son potentiel de biomarqueur dans les synucléinopathies a été initialement étudié chez les MPI, notamment en rapport avec les troubles cognitifs, le substratum scientifique d'un tel raisonnement reposant sur la cooccurrence d'agrégats d' $\alpha$ -synucléine et de TAU/A- $\beta$ .<sup>119</sup> Il a par ailleurs été décrit que les agrégats amyloïdes pourraient différencier en anatomopathologie des syndromes parkinsoniens dégénératifs entre eux.<sup>120</sup> Tout ceci pourrait être en lien avec une physiopathologie commune car, bien qu'encore incomplètement comprises, il semblerait exister des interactions physiopathologiques entre A- $\beta$  et les différentes protéines impliquées que nous avons déjà vues (p25 $\alpha$ ,  $\alpha$ -synucléine, etc.).<sup>121</sup>

Alors que la protéine A- $\beta$ 42 permettait initialement d'avoir des espoirs quant à son potentiel de biomarqueur de l'AMS en raison d'une diminution chez les AMS par rapport aux MPI, PSP et contrôles avec un seuil de significativité à 95% de 0,415 ng/ml,<sup>122</sup> seule une étude<sup>123</sup> a pu reproduire cette diminution par rapport aux contrôles, mais en utilisant une technique différente de l'ELISA des autres études ne retrouvant pas cette diminution.<sup>100,103,124</sup> Pour ce qui est de la comparaison aux MPI, ou bien entre AMS-P et AMS-C, aucune autre étude n'a pu mettre en évidence de différence<sup>100,103,123-126</sup>. Certaines données plaident néanmoins pour un taux plus élevé chez les AMS que chez les DCL et DTA,<sup>100,123</sup> et de manière plus globale chez les sujets porteurs de tauopathies que de synucléinopathies.<sup>123</sup>

La combinaison d'A- $\beta$ 42 et de des formes totales (tTAU) et phosphorylées (pTAU) de la protéine Tubule-Associated Unit (TAU) a été étudiée afin de déterminer si leur association ne pouvait permettre une meilleure acuité diagnostique. Les rapports pTAU/TAU, pTAU/A- $\beta$ 42 et TAU/ A- $\beta$ 42 n'étaient pas plus pertinents puisque sans différences entre AMS et MPI ou contrôles,<sup>103</sup> seul le rapport pTAU/TAU était diminué chez les AMS et PSP par rapport aux MPI.<sup>124</sup>

A- $\beta$ 40 n'a pas montré d'intérêt pour différencier AMS et MPI,<sup>123,124</sup> ni même les AMS des contrôles hormis le rapport A- $\beta$ 42/ A- $\beta$ 40 qui était plus bas chez les AMS.<sup>123</sup> Le rapport A- $\beta$ 38/ A- $\beta$ 42 était plus bas chez les sujets AMS que les DTA.<sup>123</sup>

Les sAPP $\alpha$  et sAPP $\beta$  étaient diminués chez les AMS en comparaison des PSP et des MPI,<sup>125</sup> mais cette étude est isolée et nécessite donc confirmation.

Ces résultats sont résumés dans le tableau 4.

**Tableau 4 Peptide précurseur de l'amyloïde et dérivés dans le LCR**

Biomarqueurs	Etudes	Effectif (n=)	Technique de dosage	Taux (en ng/ml)	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI	AMS-P vs. AMS-C	AMS vs. SPKA	AMS vs. DTA
A-β42	Holmberg et al., 2003 <sup>122</sup>	AMS-P = 22 AMS-C=14	ELISA	0,552 ± 0,195	Diminué	Diminué	Pas de différence	Diminué ☒	
	Verbeeck et al., 2004 <sup>126</sup>	AMS = 22 (probable =18) AMS-P=11 AMS-C=10	ELISA	0,851 ± 0,169	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence ☒	Diminué
	Mollenhauer et al., 2007 <sup>123</sup>	AMS-P = 12 AMS-C = 6	Aβ-SDS-PAGE	0,8 (0,3-1,9)	Diminué	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence	Diminué
	Sussmuth et al., 2010 <sup>124</sup>	AMS-P = 11 AMS-C = 14 (défini =1)	ELISA	AMS-C = 0,460 (0,177-0,623) AMS-P = 0,437 (0,387-0,829)	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence ☒	
	Shi et al., 2011 <sup>103</sup>	32 (>50ans + Hb < 200µg/l = 20)	BBMA	0,312±0,120	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence		Pas de différence
	Mollenhauer et al., 2011 <sup>99</sup>	29 15	ELISA	0,46 (0,187- 0,752)					
	Jesse et al., 2011 <sup>127</sup>	AMS-P = 12 AMS-C = 13	ELISA	AMS-P = 0,755 ± 0,105 AMS-C= 0,794 ± 0,250					
	Hall et al., 2012 <sup>100</sup>	48	BBMA	589 (533-684)	Pas de différence	Pas de différence*	Pas de différence	Augmenté**	Augmenté
	Bech et al., 2012 <sup>125</sup>	10	ELISA	Entre 0,5 et 0,6		Pas de différence	Pas de différence		
A-β40	Sussmuth et al., 2010 <sup>124</sup>	AMS-P = 11 AMS-C = 14	ELISA			Pas de différence			
	Mollenhauer et al., 2007 <sup>123</sup>	AMS-P = 12 AMS-C = 6	Aβ-SDS-PAGE	5,5 (3,0 – 9,0)	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence
sAPPα	Bech et al., 2012 <sup>125</sup>	10	ELISA	Environ 290		Diminué		Diminué ☒	
sAPPβ	Bech et al., 2012 <sup>125</sup>	10	ELISA	Environ 190		Diminué		Diminué ☒	

NB : \*AMS vs. MPI et MPI-D. \*\*AMS vs. DCL. ☒ AMS vs. PSP. Aβ-SDS-PAGE = électrophorèse sur gel basée sur l'urée avec immunoblot. AMS = Atrophie multisystématisée (AMS-P = AMS forme parkinsonienne ; AMS-C = AMS forme cérébelleuse). BBMA = Bead Based Multianalyte Assay. DTA = Démence de Type Alzheimer. ELISA = méthode immunoenzymatique. Hb = hémoglobine. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique. sAPPα = fraction soluble α du peptide précurseur de l'amyloïde. sAPPβ = fraction soluble β de l'APP. SPKA = Syndromes Parkinsoniens Atypiques.

### *b) Système ubiquitine-protéasome*

La dégradation de l' $\alpha$ -synucléine semblerait être possible via plusieurs voies, principalement via l'autophagie, mais aussi la voie du système ubiquitine-protéasome.<sup>65</sup> La protéine Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) est un des composants clés du système ubiquitine-protéasome. Cette molécule a donc été dosée,<sup>104</sup> permettant de retrouver un taux diminué chez les AMS (et MPI et PSP) par rapport aux contrôles (mais sans différence DCB/contrôles), avec notamment une diminution moins marquée chez les AMS que chez les MPI, distinguant ainsi ces deux maladies. Il n'y avait pas de différence entre AMS-P et AMS-C, et une corrélation UCH-L1/ $\alpha$ -synucléine chez les synucléinopathies mais cette liaison était perdue lorsque l'analyse faite pour chaque groupe séparément. Le taux d'UCH-L1 était corrélé au stade Hoehn et Yahr des synucléinopathies dans cette étude.

L'ubiquitine, au sein d'un pool d'autres protéines, a été retrouvée élevée dans le groupe des syndromes parkinsoniens atypiques (AMS, PSP) par rapport aux MPI et contrôles dans une seule étude,<sup>128</sup> mais il n'y avait pas de différence entre AMS et MPI.

### *c) DJ-1*

Cette protéine, codée par le locus PARK7, dont le rôle physiologique n'est pas encore clairement élucidé mais serait impliquée dans la réaction cellulaire au stress oxydatif. Le taux de DJ-1 dans le LCR est sensible à la contamination sanguine lors de la réalisation du prélèvement, il est donc nécessaire d'exclure les prélèvements fortement contaminés. Elle a été le sujet de plusieurs études mais dont les résultats sont très contradictoires et les taux très différents (cf. tableau 5), faisant remettre en cause son dosage (notamment en raison des différentes techniques utilisées selon les études : ELISA, BBMA...):

- DJ-1 n'a pas montré de différence entre AMS et MPI<sup>103</sup> dans une première étude mais était présente à un taux plus important chez les AMS que les MPI dans une étude plus récente.<sup>106</sup>
- Les résultats de comparaison entre AMS et contrôles sains sont contradictoires également : soit diminuée,<sup>103</sup> soit sans différence significative,<sup>129</sup> soit augmentée.<sup>106</sup>
- Les malades atteints de DTA semblaient présenter un taux supérieur aux AMS.<sup>103</sup>

Il n'y avait pas de corrélation entre taux dans le LCR de DJ-1 et durée d'évolution<sup>106,129</sup> ni sévérité clinique de la maladie.<sup>106</sup>



**Tableau 5 DJ-1 dans le LCR**

Etudes	Effectif des sujets AMS (n=)	Technique de dosage	Taux en ng/ml	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI	AMS-P vs. AMS-C	AMS vs. SPKA	AMS vs. DTA
Shi et al., 2011 <sup>103</sup>	32 (> 50 ans = 28) (>50ans + Hb < 200µg/l = 20)	BBMA	23,8 ± 7,5	Diminué	Pas de différence			Diminué
Salvesen et al., 2012 <sup>129</sup>	26 à l'inclusion, 14 au suivi	ELISA	9,3 (6,9 ; 12,6)	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence*	
Herbert et al., 2014 <sup>106</sup>	23	ELISA	0,71 ± 0,156	Augmenté	Augmenté	Pas de différence		

NB: \* AMS vs. PSP + DCL. AMS = Atrophie Multisystématisée (AMS-P = AMS forme parkinsonienne ; AMS-C = AMS forme cérébelleuse). BBMA = Bead Based Multianalyte Assay. DCL = Démence à Corps de Lewy. DTA = Démence de Type Alzheimer. ELISA = méthode immunoenzymatique sur support solide. Hb = hémoglobine. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique. PSP = Paralyse Supranucléaire Progressive.

#### *d) Marqueurs de la neuroinflammation*

Des processus inflammatoires étant mis en jeu dans la cascade physiopathologique de l'AMS (cf. supra), les marqueurs de la neuroinflammation ont été étudiés. Ils sont nombreux et peuvent provenir aussi bien du LCR que du plasma. L'ensemble de ces résultats est résumé dans le tableau 6.

##### Flt3 ligand

Le Flt3 est une protéine appartenant à la classe des kinases des récepteurs à la tyrosine. Le Fms-related tyrosine kinase (Flt3) ligand est une glycoprotéine transmembranaire de 30 kDa, existant naturellement comme un homodimère (relié par un pont non disulfure), et dont plusieurs formes sont connues. Il existe aussi bien dans le domaine extra qu'intracellulaire. Ses fonctions biologiques commencent à être relativement bien élucidées dans la lymphopoïèse (marqueur CD135) ; du point de vue neurologique, il s'agit d'un facteur neurotrophique et anti-apoptotique au niveau du système nerveux central.<sup>130-132</sup> C'est donc pour cela qu'il a été étudié chez les patients atteints d'AMS et MPI. Dosé à  $0,0215 \pm 0,0095$  ng/ml chez les sujets AMS, sa diminution permettait dans une première étude<sup>103</sup> de différencier de manière significative AMS et contrôles, mais aussi AMS et MPI ainsi qu'AMS et DTA. L'étude des courbes ROC a permis de déterminer une sensibilité à 99% et une spécificité à 95% - aire sous la courbe (AUC) = 0,98 - en ce qui concerne la discrimination entre AMS et MPI. Ces performances ont été reproduites sur une autre cohorte de patients avec MPI : classant bien 32 des 35 MPI, permettant d'atteindre une sensibilité de 91,4% (spécificité inchangée à 95% en raison du fait qu'il s'agissait des mêmes sujets AMS). Le Flt3 ligand était également performant pour différencier AMS et contrôles (sensibilité 95%, spécificité 90%).<sup>103</sup>

Ces résultats n'ont pas été confirmés lors d'une deuxième étude,<sup>133</sup> celle-ci ne retrouvant pas de différence entre les AMS, les MPI ou les PSP sur le taux de Flt3 ligand dans le LCR, malgré l'utilisation de la même technique que lors de l'étude précédente. Le Flt3 ligand n'était pas non plus corrélé à la durée d'évolution ni à la sévérité de la maladie chez les AMS, mais seulement à l'âge.

##### Fractalkine

La fractalkine, facteur neurotrophique et anti-apoptotique dans le SNC, ne différait pas entre AMS, MPI, contrôles et DTA.<sup>103</sup>

##### YKL-40

Plus récemment, un marqueur de l'activation microgliale (YKL-40) a apporté des résultats intéressants: physiologiquement corrélé à l'âge, l'analyse prenant donc en compte ces éléments n'a pas trouvé de différence dans le sang entre AMS, MPI et contrôles, ni même dans le LCR entre AMS et contrôles. Mais une diminution dans le LCR chez les MPI par rapport aux AMS est ressortie comme significative. YKL-40 est augmenté chez les synucléinopathies par rapport aux tauopathies.<sup>134</sup>

La même étude n'a pas retrouvé de résultat concluant concernant un autre marqueur de l'activation microgliale, le CD14 soluble (sCD14).<sup>134</sup>

### GFAP

La protéine acide fibrillaire gliale (Glial Fibrillary Acidic Protein = GFAP), qui pourrait être marqueur de l'activation astrocytaire, n'a pas montré sa pertinence ni pour différencier AMS et MPI, ni AMS-P et AMS-C,<sup>124,135-137</sup> ni même AMS et contrôles,<sup>124,137</sup> ou bien encore AMS et autres SPKA.<sup>137</sup> Il n'y a pas de corrélation entre durée d'évolution et taux de GFAP.<sup>137</sup> Seul un test binomial a permis de retrouver un GFAP plus fréquemment élevé chez les MPI et les PSP en comparaison des contrôles, à la différence des AMS.<sup>124</sup>

### Cascade du complément

Le complément intervenant dans la cascade inflammatoire et donc dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives, une équipe américaine a étudié le complément 3 (C3) qui a un rôle central dans la cascade du complément en aidant à la réponse pro-inflammatoire et le Facteur H (FH) qui régule l'activité de C3. Ces deux éléments étaient âge-dépendants, sexe dépendants (sauf le rapport C3/FH) mais aussi sensible à la contamination sanguine. Ils ont donc exclu les sujets de moins de 50 ans et ceux dont le prélèvement de LCR contenait plus de 200 ng/ml d'hémoglobine. Si C3 était significativement diminué chez les AMS par rapport aux MPI, DTA et contrôles alors que FH ne l'était pas, les performances diagnostiques de ces deux protéines restaient très médiocres (sensibilité et spécificité < 60%). Le rapport C3/FH était plus efficace (voir partie V-c-2).<sup>138</sup>

### Cytokines pro-inflammatoires systémiques

Les processus inflammatoires étant suspects d'être impliqués dans la physiopathologie, le dosage des cytokines et marqueurs pro-inflammatoires dans le sang a été réalisé. La C reactive-protein (CRP) et le récepteur soluble à l'interleukine 2 (sIL-2R) n'ont pas été discriminants. A la différence de l'IL-6 et du Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) : leur taux était plus élevé chez les AMS que les contrôles, mais sans différence entre AMS-P et AMS-C. Le TNF- $\alpha$  semblait refléter la neurodégénérescence avec une corrélation inverse entre son taux et le stade Hoehn et Yahr ainsi que l'UPDRS-III, et une corrélation positive avec l'échelle utilisée pour évaluer les activités de la vie quotidienne.<sup>139</sup>

**Tableau 6 Marqueurs de la neuroinflammation**

Biomarqueurs	Etudes	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI	AMS-P vs. AMS-C
Flt3-ligand	Shi et al., 2011 <sup>103</sup>	Diminué	Diminué	
	Silajdzic et al., 2014 <sup>133</sup>		Pas de différence	
Fractalkine	Shi et al., 2011 <sup>103</sup>	Pas de différence	Pas de différence	
YKL-40	Olsson et al., 2013 <sup>134</sup>	Pas de différence	Augmenté	
sCD14	Olsson et al., 2013 <sup>134</sup>	Pas de différence	Pas de différence	
GFAP	Holmberg et al., 1998 <sup>136</sup>		Pas de différence	
	Sussmuth et al., 2010 <sup>124</sup>	Test binomial : augmenté?	Pas de différence	Pas de différence
	Abdo et al., 2004 <sup>135</sup>		Pas de différence	
	Constantinescu et al., 2010 <sup>137</sup>	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence
C3	Wang et al., 2011 <sup>138</sup>	Diminué	Diminué	
FH	Wang et al., 2011 <sup>138</sup>	Pas de différence	Pas de différence	
C3/FH	Wang et al., 2011 <sup>138</sup>	Diminué	Diminué	
TNF- $\alpha$ plasmatique	Kaufman et al., 2013 <sup>139</sup>	Augmenté		Pas de différence
IL-6 plasmatique	Kaufman et al., 2013 <sup>139</sup>	Augmenté		Pas de différence
CRP plasmatique	Kaufman et al., 2013 <sup>139</sup>	Pas de différence		Pas de différence
sIL-2R plasmatique	Kaufman et al., 2013 <sup>139</sup>	Pas de différence		Pas de différence

**NB : AMS = Atrophie multisystématisée (AMS-P = AMS forme parkinsonienne ; AMS-C = AMS forme cérébelleuse). BBMA = Bead-based Multianalyte Assay. C3 = Complément 3. CRP = C Reactive Protein. FH = Facteur H. GFAP = Protéine Acide Fibrillaire Gliale. IL-6 = Interleukine 6. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique. sCD14 = CD14 soluble. sIL-2R = récepteur soluble à l'interleukine 2. TNF- $\alpha$  = Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ .**

### e) *Stress oxydatif*

Le glutathion a été proposé comme le premier anti oxydant sécrété par la cellule en réponse à la production de radicaux libres. Il n'existe que très peu de données concernant cette molécule, mais il ne semble pas y avoir de différence entre AMS, MPI, MPI avec démence (MPI-D), mais aussi contrôles et DTA. Le taux de glutathion n'était pas non plus associé à l'âge, au sexe ni à la durée d'évolution.<sup>140</sup>

Un autre reflet du stress oxydatif est son action sur l'ADN ou l'ARN. Les 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG, produit de l'hydroxylation en C8 de la désoxyguanosine) et 8-hydroxyguanosine (8-OHG, produit de l'hydroxylation en C8 de la guanosine), produits de l'oxydation respectivement de l'ADN et de l'ARN, sont des bons reflets des effets du stress oxydatif sur la cellule. C'est pourquoi leur dosage par l'équipe de Kikuchi et collaborateurs a été fait. Le résultat est intéressant puisque conforme à l'hypothèse des auteurs, le rapport 8-OHdG / 8-OHG est plus important chez les AMS que chez les témoins, mais aussi chez les AMS que chez les MPI.<sup>141</sup>

Le tableau 7 synthétise les deux principaux résultats.

**Tableau 7 Marqueurs du stress oxydatif**

Biomarqueurs	Etudes	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI
Glutathion	Koning et al., 1999 <sup>140</sup>	Pas de différence	Pas de différence
8-OHdG / 8-OHG	Kikuchi et al., 2002 <sup>141</sup>	Augmenté	Augmenté

NB : 8-OHdG = 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine ; 8-OHG = 8-hydroxyguanosine. AMS = Atrophie Multisystématisée. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique.

### f) *Protéome et métabolome*

#### Protéome

Très peu d'études ont jusqu'ici étudié le protéome dans le LCR de patients atteints d'AMS.

La première étude<sup>128</sup> s'intéressait à la comparaison MPI vs. SPKA, et non pas à l'AMS exclusivement. Grâce à une technique laser d'adsorption/ionisation avec spectrométrie de masse avec temps de vol (SELDI-TOF MS) et d'autres manipulations chimiques (chromatographie, etc.), ils avaient analysé le protéome dans le LCR de sujets sains (n=24) et de porteurs de syndromes parkinsoniens (MPI=56, AMS=42, PSP=39, DCB=9). Deux mille pics ont été identifiés, caractérisés par un ratio masse/charge (m/z), qui après traitement, furent réduits à 4 qui différenciaient bien MPI et SPKA :

- Sécrétogranine 1 (= chromogranine B) fragment 1 : m/z 7260
- Sécrétogranine 1 (= chromogranine B) fragment 2 : m/z 6250
- Ubiquitine : m/z 8590

- $\beta$ -2-microglobuline : m/z 11730

Le niveau des chromogranines était plus bas chez les patients atteints de SPKA que chez les MPI et les contrôles. La  $\beta$ -2-microglobuline et comme vu ci-dessus l'ubiquitine, étaient plus élevées chez les SPKA (PSP, AMS, DCB) que les MPI et contrôles. Le seul pic retrouvant une différence significative lors de la comparaison entre AMS et MPI était le m/z 7260, correspondant à la Sécétogranine 1 fragment 1. Le seul pic différenciant AMS et contrôle était m/z 6250, correspondant à la Sécétogranine 1 fragment 2. Mais pour différencier MPI et SPKA, les quatre pics étaient nécessaires (AUC = 0,8).

La dernière étude<sup>142</sup> a traité la question au moyen de deux techniques : l'Analyse en Composantes Principales, en anglais Principal Component Analysis (PCA) et le modèle des Machines à Vecteurs de Supports, en anglais Support Vector Machine (SVM). Conformément aux dernières recommandations, ils ont testé l'analyse du protéome sur deux cohortes successives.

La technique PCA a permis, sur la première cohorte qui comprenait (entre autres) 26 MPI, 23 AMS et 26 contrôles, de démontrer une différence très claire entre AMS et contrôles, et une différence possible entre AMS et MPI mais cette analyse nécessitait la prise en compte de plusieurs pics. Sur la cohorte de validation, la différence entre AMS et MPI était plus nette, bien que là encore nécessitant la prise en compte de plusieurs pics. De façon très intéressante, la différence était encore plus notable lorsque n'étaient pris en compte que les sujets de courte durée d'évolution (< 3 ans). Cette technique isolait le pic m/z 6250 (technique de spectroscopie de masse) comme marqueur très fiable : fortement exprimé chez les contrôles, peu exprimé chez les MPI et encore plus faiblement exprimé chez les AMS. L'ordre est respecté lorsque l'on ne prend en compte que les sujets dont la pathologie évolue depuis moins de trois ans. L'analyse des courbes ROC a permis de déterminer des capacités diagnostiques tout à fait intéressantes, avec une aire sous la courbe de 0,826 lorsque l'on compare AMS et contrôles, 0,763 lorsque l'on compare AMS et MPI, avec l'amélioration des performances chez les sujets évoluant depuis peu de temps matérialisée par une aire sous la courbe à 0,886 pour AMS précoce vs. contrôles et 0,956 pour AMS précoces vs. MPI précoces.

La technique SVM, utilisée dans le but de faire le diagnostic différentiel entre AMS et MPI, a permis de retrouver une Valeur Prédictive Positive de 80%, une sensibilité de 88,9% et une spécificité de 81,8% pour l'AMS ; pour la MPI, les valeurs respectives étaient de 90%, 81,8% et 88,9%.

En conclusion, MPI et AMS et contrôles sont clairement distingués par la technique PCA (via plusieurs pics), SVM montre une sensibilité et une spécificité supérieures à 80% pour le diagnostic différentiel entre MPI et AMS, et le pic m/z 6250 une très bonne performance diagnostic (AUC 0,956).

Comme nous l'avons vu précédemment, le pic m/z 6250 représente la Sécétogranine 1 (chromogranine B) fragment 2. Il s'agit d'un peptide exprimé de façon diffuse dans le système nerveux et les tissus neuroendocrines. Dans les neurones, elle est stockée dans les vésicules à cœur dense, avec les peptides neurosécrétoires, et agit sur de nombreuses fonctions intracellulaires et extracellulaires.<sup>143-145</sup> La chromogranine B semble spécifique du neurone, et stimuler la croissance du neurite.<sup>146</sup> En 2010, Constantinescu et collaborateurs s'appuyaient sur une étude plus ancienne<sup>136</sup> pour expliquer le lien de cette diminution chez les AMS : elle pourrait être reliée à la perte neuronale ou synaptique, notamment parce que l'élévation des protéines du neurofilament reflète un processus neurodégénératif plus agressif chez les syndromes parkinsoniens atypiques que les MPI (cf. IV-b.2.a).

La limite de la technique SELDI-TOF MS est qu'elle détecte préférentiellement les protéines à expression élevée, alors que des protéines intéressantes mais à expression peu importante (comme TAU ou neurofilament) ne sont pas détectées.

### Polyamines

Un peu plus tôt, une équipe sud-coréenne s'est intéressée aux polyamines (cf. tableau 8). Ces polyamines ont été étudiées en raison de leur relation directe avec le fonctionnement biochimique neuronal, leur interaction directe avec les neurotransmetteurs mais aussi leur rôle dans la lutte contre le stress oxydatif. Ils ont donc étudié 4 polyamines : putrescine et cadavérine, issues de la dégradation protéique (et responsable de l'odeur nauséabonde des cadavres animaux) ; et spermidine et spermine qui agissent comme hormones de croissance pour les cellules eucaryotes et procaryotes. Leurs analyses en chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse ont permis de retrouver une différence entre AMS et contrôles, mais aussi entre AMS et MPI. En comparaison aux contrôles, les AMS présentaient un taux plus élevé de N-acétyl-cadavérine, de cadavérine, de N(8)-acétyl-spermidine, un taux total de polyamines, et le ratio putrescine/spermidine était plus élevé ; alors que la N-acétyl-putrescine et la N(1)-acétyl-spermidine étaient diminuées. En comparaison aux MPI, N(1)-acétyl-spermidine, putrescine et le ratio putrescine/spermidine étaient augmentés, alors que la spermidine était diminuée.<sup>147</sup>

### Acides gras poly insaturés

Cette équipe avait déjà utilisé ces techniques afin d'étudier les acides gras poly insaturés chez les patients AMS et MPI (cf. tableau 8). Ils avaient pu montrer que seul l'acide eicosapentaénoïque (EPA) était supérieur au seuil de dosage, qu'il était élevé chez les AMS et les MPI par rapport aux contrôles mais sans différence entre AMS et MPI. Une partie intéressante de leurs résultats était également la corrélation entre le taux d'EPA et le score UMSARS. Les auteurs tentent d'expliquer cette augmentation par deux hypothèses : la première serait une augmentation de l'EPA comme conséquence de l'oligomérisation de l' $\alpha$ -synucléine, la seconde comme une réponse à la

neurodégénérescence en raison des propriétés anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et protectrices de la mitochondrie de l'EPA.<sup>148</sup>

**Tableau 8 Polyamines et acides gras polyinsaturés**

Biomarqueurs	Etudes	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI
Putrescine	Paik et al., 2010 <sup>147</sup>	Pas de différence	Augmenté
Cadavérine	Paik et al., 2010 <sup>147</sup>	Augmenté	Pas de différence
Spermidine	Paik et al., 2010 <sup>147</sup>	Pas de différence	Diminué
N-acétyl-cadavérine	Paik et al., 2010 <sup>147</sup>	Augmenté	Pas de différence
N-acétyl-putrescine	Paik et al., 2010 <sup>147</sup>	Diminué	Pas de différence
N(1)-acétyl-spermidine	Paik et al., 2010 <sup>147</sup>	Diminué	Augmenté
N(8)-acétyl-spermidine	Paik et al., 2010 <sup>147</sup>	Augmenté	Pas de différence
Putrescine/spermidine	Paik et al., 2010 <sup>147</sup>	Augmenté	Augmenté
EPA	Lee et al., 2008 <sup>148</sup>	Augmenté	Pas de différence

**NB : AMS = Atrophie Multisystématisée. EPA = acide eicosapentaénoïque. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique.**

### Micro-Acides Ribonucléiques

Une des dernières études et des plus intéressantes est celle concernant les micro-ARNs (miARNs, ARNs pour Acides Ribonucléiques) dans le diagnostic différentiel entre AMS et MPI.<sup>149</sup> Ce domaine, d'un intérêt majeur en raison de ses liens avec les mécanismes physiopathologiques, est en pleine expansion dans de nombreux domaines de la médecine et de la neurologie. Mais il n'a encore que très peu été étudié comme biomarqueurs de l'AMS puisqu'il s'agit de la première publication sur le sujet. En utilisant une technique appelée « Taqman Low Density Array » (TLDA), basée sur de la PCR en temps réel et capable d'identifier 754 miARNs différents, ils ont identifié 324 miARNs circulants dans le sérum de patients MPI, AMS et sujets sains. Après une première cohorte sur un petit nombre de sujets, ils ont renouvelé les analyses sur une cohorte plus conséquente (25 AMS, 25 MPI, 25 contrôles), pour retrouver des miARNs permettant de différencier les trois groupes ; les résultats sont résumés dans le tableau 9. L'analyse en ontogénèse a montré une implication de ces miARNs dans la régulation des cycles cellulaires, la modulation de l'apoptose, les modifications post translationnelles, avec une expression très forte dans le système nerveux central. Aucun chiffre de sensibilité ou de spécificité n'est donné, mais à la vue des résultats, le miARN le plus intéressant pour différencier MPI et AMS semblerait être le miR 148b car semblerait être augmenté uniquement chez les AMS, et non chez les MPI. Les miR 24, miR 223\* et miR 324-3p pourraient refléter une voie physiopathologique commune des deux maladies, le miR 24 possiblement plus marqué chez les AMS que les MPI. Les différences physiopathologiques et une discrimination des patients pourraient être mises en évidence par le miR 148b et le miR 339-5p, voire le miR 30c puisqu'il ne ressort significatif que lors de



l'analyse des MPI en comparaison des contrôles, et pas des AMS. On peut donc imaginer qu'il sera possible, après répliation de ces résultats dans de futures études à effectifs plus conséquents, d'établir un profil de miARNs spécifique pour les AMS, les MPI, les sujets contrôles, etc. Il n'est pas fait mention d'une quelconque corrélation entre les miARNs et la durée d'évolution ou la sévérité de la maladie.

**Tableau 9 Métabolome**

miARNs	MPI + AMS vs. contrôles	MPI vs. contrôles	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI
miR 24	Augmenté	Augmenté	Augmenté	Augmenté
miR 223*	Augmenté	Augmenté	Augmenté	
miR 324-3p	Augmenté	Augmenté	Augmenté	
miR 339-5p	Diminué		Diminué	
miR 30c		Diminué		
miR 148b		Diminué	Augmenté	Augmenté
miR 34b				Augmenté

**NB : AMS = Atrophie Multisystématisée. miARNs = micro ARNs. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique.**

## 2. Marqueurs de la dégénérescence

### a) Axonale

#### TAU/PhosphoTAU

Les protéines TAU totale (tTAU) et phosphorylée (pTAU) ont montré leur intérêt comme biomarqueurs de la DTA et sont aujourd'hui utilisées en pratique clinique. Elles ont également été étudiées pour l'AMS :

- La protéine tTAU a amené à des résultats contradictoires (cf. tableau 10). Si des études ont retrouvé un taux plus important chez les AMS que les MPI<sup>100,106,124,135</sup> et une étude chez les AMS-P que les MPI,<sup>150</sup> deux autres équipes n'ont pas retrouvé cette différence.<sup>103,125</sup> Lors de la comparaison aux contrôles, il en est de même : tantôt augmentée chez les AMS-P<sup>150</sup> ou les AMS au sens large,<sup>106,124,151</sup> tantôt sans différence significative.<sup>100,103</sup> Deux études concordent pour dire qu'il n'y a pas de différence entre AMS-P et AMS-C.<sup>124,150</sup> Le résultat montrant que tTAU est plus élevé chez les sujets DTA qu'AMS<sup>100,103</sup> est par contre relativement attendu à la vue de la physiopathologie de ces affections. Enfin, tTAU n'a pas permis de différencier les SPKA (PSP, DCL et AMS).<sup>100,125</sup> Pas de corrélation entre tTAU et durée d'évolution ou degré de sévérité clinique notée par ailleurs.<sup>106</sup>

- Phospho TAU (pTAU) a montré des résultats plus constants (cf. tableau 11). Si elle est diminuée chez les AMS par rapport aux DTA,<sup>100,103</sup> il n'a pas été retrouvé de différence entre AMS et MPI<sup>103,106,124,125</sup> sauf dans une étude comprenant MPI et MPI-D.<sup>100</sup> Il n'y a pas de différence entre AMS-P et AMS-C,<sup>103,124,125</sup> ou bien encore entre AMS et contrôles<sup>103,124</sup> ; seule une étude faisant exception sur ce point avec un taux plus élevé chez les contrôles.<sup>100</sup> La protéine pTAU amène également des résultats contradictoires en comparant AMS et DCL : tantôt sans différence,<sup>125</sup> tantôt plus important chez les DCL<sup>100</sup> ; les résultats en comparaison aux PSP sont plus constants : il n'y a pas de différence.<sup>100,124,125</sup> Il n'y a pas de corrélation retrouvée entre pTAU et durée d'évolution ou degré de sévérité clinique.<sup>106</sup>

**Tableau 10 Protéine TAU totale (tTAU) dans le LCR**

Etudes	Effectif (n=)	Technique de dosage	Taux (en ng/ml)	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI	AMS-P vs. AMS-C	AMS vs. SPKA	AMS vs. DTA
Abdo et al., 2004 <sup>135</sup>	30 (probable=26)	ELISA	AMS-C = 0,242 (0,210-0,386)		Augmenté			
	AMS-P=15, AMS-C=14, AMS-P+C = 1		AMS-P= 0,259 (0,193-0,320)					
Mollenhauer et al., 2007 <sup>123</sup>	AMS-P = 12 ; AMS-C = 6	ELISA	0,353 (0,255-0,450)	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence	Diminué
Sussmuth et al., 2010 <sup>124</sup>	AMS-P = 11 AMS-C = 14	ELISA	AMS-C = 0,239 (0,107-0,439)	Augmenté	Augmenté	Pas de différence	Pas de différence***	
			AMS-P= 0,22 (0,136- 0,488)					
Abdo et al., 2007 <sup>150</sup>	19 (probable =16)	ELISA	0,265 (0,207-0,320)	Augmenté	Augmenté	Pas de différence		
Shi et al., 2011 <sup>103</sup>	32 (>50ans + Hb < 200µg/l = 20)	BBMA	0,0467±0,0189	Pas de différence	Pas de différence			Diminué
Abdo et al., 2007 <sup>151</sup>	AMS-P = 19 (Probable= 16, Défini =1) AMS-C = 26 (probable = 12, défini = 3)	ELISA	AMS-C = 0,296±0,103 AMS-P = 0,255 ± 0,093	Augmenté				
Mollenhauer et al., 2011 <sup>99</sup>	29	ELISA	0,147 (0,075-0,527)		Pas de différence			Diminué
	15		0,146 (0,075-0,317)					
Jesse et al., 2011 <sup>127</sup>	AMS-P = 12 AMS-C = 13	ELISA	AMS-P = 0,239 ± 0,101 AMS-C= 0,221 ± 0,074					
Hall et al., 2012 <sup>100</sup>	48	BBMA	528 (316-770)	Pas de différence	Augmenté*		Pas de différence	Diminué
Bech et al., 2012 <sup>125</sup>	10	ELISA			Pas de différence		Pas de différence	
Herbert et al., 2014 <sup>106</sup>	23 (AMS+Hb<0,1µg/l = 18)	ELISA	0,284 ± 0,131	Pas de différence	Augmenté			

NB : \* AMS vs. MPI et MPI-D. \*\*AMS vs. DCL. \*\*\* AMS vs. PSP. AMS = Atrophie multisystématisée (AMS-P = AMS forme parkinsonienne ; AMS-C = AMS forme cérébelleuse). BBMA = Bead Based Multianalyte Assay. DTA = Démence de Type Alzheimer. ELISA = méthode immunoenzymatique sur support solide. Hb = hémoglobine. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique. tTAU = TAU totale. pTAU = TAU phosphorylée. SPKA = Syndromes Parkinsoniens Atypiques.

**Tableau 11 Protéine TAU phosphorylée (pTAU) dans le LCR**

Etudes	Effectif (n=)	Technique de dosage	Taux (en ng/ml)	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI	AMS-P vs. AMS-C	AMS vs. SPKA	AMS vs. DTA
Shi et al., 2011 <sup>103</sup>	32 (>50ans + Hb < 200 = 20)	BBMA	0,0224±0,0107	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence		Diminué
Sussmuth et al., 2010 <sup>124</sup>	AMS-P = 11 AMS-C = 14	ELISA	AMS-C = 0,029 (0,0199-0,0592)	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence***	
			AMS-P = 0,0397 (0,0226-0,0586)					
Hall et al., 2012 <sup>100</sup>	48	BBMA	42 (42-45)	Diminué	Diminué*		Diminué** Pas de différence***	Diminué
Bech et al., 2012 <sup>125</sup>	10	ELISA			Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence***	
Herbert et al., 2014 <sup>106</sup>	23 (AMS+Hb<0,1µg/l = 18)	ELISA	0,0493 ± 15,8	Pas de différence	Pas de différence			

NB : \* AMS vs. MPI et MPI-D. \*\*AMS vs. DCL. \*\*\* AMS vs. PSP. AMS = Atrophie multisystématisée (AMS-P = AMS forme parkinsonienne ; AMS-C = AMS forme cérébelleuse). BBMA = Bead Based Multianalyte Assay. DTA = Démence de Type Alzheimer. ELISA = méthode immunoenzymatique sur support solide. Hb = hémoglobine. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique. tTAU = TAU totale. pTAU = TAU phosphorylée. SPKA = Syndromes Parkinsoniens Atypiques. µ = microgramme/l.

### Protéines du neurofilament

La protéine du neurofilament est un constituant majeur de la structure du neurone. Son rôle principal est de maintenir le calibre de l'axone, de même que la taille du neurone. Depuis 1998, plusieurs auteurs se sont intéressés au potentiel des protéines du neurofilament comme marqueur biologique potentiel de l'AMS.

Les premiers ont été l'équipe de Holmberg<sup>136</sup> qui montrait que la chaîne légère du neurofilament (NFL) était plus élevée chez les patients atteints d'une AMS que d'une MPI, et ce malgré la durée d'évolution moyenne de la MPI plus élevée que celle des AMS. Ce résultat a été confirmé par la même équipe et la performance diagnostique était améliorée par l'association au test aigu à la lévodopa.<sup>152</sup> Une troisième étude n'a pu reproduire ces résultats<sup>137</sup> en étudiant l'ensemble des AMS, alors qu'une étude comparant AMS-P et MPI a confirmé cette élévation.<sup>150</sup> Cette élévation a été retrouvée à la fois en comparaison des AMS aux MPI sans démence et aux MPI-D.<sup>100</sup> Pour ce qui est des SPKA, l'élévation dans le groupe « AMS+DCB+PSP » en comparaison aux MPI<sup>100,136,137,150,152</sup> ou bien « AMS+PSP+DCL » vs. MPI a été réévaluée mais sans mention faite de comparaison entre les différents syndromes parkinsoniens atypiques.<sup>125</sup> Cependant, il ne semble pas y avoir de différence entre PSP et AMS voire DCB.<sup>100,136,137,152</sup> Une élévation a été montrée en comparaison aux DCL.<sup>100</sup> Les résultats semblent concordants concernant une élévation chez les AMS par comparaison aux contrôles, aussi bien AMS-C qu'AMS-P<sup>100,136,150,151</sup> mais sans différence entre AMS-C et AMS-P.<sup>136,137,151,152</sup> Pour ce qui est de marquer la dégénérescence au cours du temps, seules deux études prospectives ont été menées, sans retrouver de différence entre les ponctions lombaires à un an d'intervalle,<sup>137,153</sup> ni de corrélation avec la durée d'évolution.<sup>137</sup> Il n'y a pas non plus de corrélation avec l'âge ou le stade Hoehn-Yahr.<sup>100</sup>

Plus récemment, la fraction lourde du neurofilament (NFH) a été étudiée. Dans la littérature, elle prend plusieurs noms : NfH-SMI 35 ou NFHp35. Un taux significativement plus élevé chez les AMS que les contrôles a été retrouvé par des équipes différentes.<sup>135,150,151,154</sup> Cette élévation se retrouve aussi en comparaison entre AMS et MPI<sup>154</sup> ou entre AMS-P et MPI,<sup>150</sup> ainsi qu'en comparaison entre AMS et DCB.<sup>154</sup> Les AMS-C présentaient un taux médian (3,1ng/ml) plus élevé que les MSA-P (0,3ng/ml) mais le trop petit nombre de sujets n'avait pas permis de faire de statistiques sur cet échantillon.<sup>154</sup> Tout ceci est résumé dans le tableau 12.

**Tableau 12 Protéines du neurofilament dans le LCR**

Biomarqueurs	Etudes	Effectif	Technique de dosage	Taux (ng/ml)	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI	AMS vs. SPKA	AMS-P vs. AMS-C
NFL	Holmberg et al., 1998 <sup>136</sup>	AMS-P=5 ; AMS-C=5	ELISA	0,92±0,46	Augmenté	Augmenté	Pas de différence	Pas de différence
	Holmberg et al., 2001 <sup>152</sup>	AMS-P=29 ; AMS-C=7	ELISA	0,864 ± 0,737		Augmenté	Pas de différence	Pas de différence
	Abdo et al., 2007 <sup>150</sup>	19 (probable =16 ; défini = 1)	ELISA	0,0334 (0,0183-0,062)	Augmenté	Augmenté		Pas de différence
	Abdo et al., 2007 <sup>151</sup>	AMS-P = 19 (Probable= 16, défini =1) AMS-C = 26 (probable = 12, défini = 3)	ELISA	AMS-C = 0,043 ± 0,025	Augmenté			
				AMS-P = 0,039 ± 0,024				
	Petzold et al., 2009 <sup>153</sup>	Initial = 42 6 mois = 32 12 mois = 20	ELISA	Initial = 1,4	Pas de comparaison	Pas de comparaison	Pas de comparaison	Pas de comparaison
				6 mois = 1,36				
				12 mois = 1,42				
Constantinescu et al., 2010 <sup>137</sup>	AMS-P = 14 ; AMS-C = 7	ELISA	Initial = 1,207 (0,250-6,030)	Augmenté	Pas de différence	Pas de différence	Pas de différence	
			12 mois = 1,250 (0,250-3,940)					
Bech et al., 2012 <sup>125</sup>	10	ELISA	Environ 0,1		Augmenté*			
Hall et al., 2012 <sup>100</sup>	48	ELISA	4075 (2270-7105) ng/ml	Augmenté	Augmenté**	Augmenté ***		
NFH	Brettschneider et al., 2006 <sup>154</sup>	AMS-P = 11 AMS-C = 10	ELISA	AMS-C = 3,1	Augmenté	Augmenté	Augmenté**** Pas de différence ☒	Tendance augmentation chez AMS-C
				AMS-P = 0,3				
	Abdo et al., 2007 <sup>150</sup>	19 (probable =16 ; défini = 1)	ELISA	0,191 (0,123-0,283)	Augmenté	Augmenté		
	Abdo et al., 2007 <sup>151</sup>	AMS-P = 19 (Probable= 16, défini =1) AMS-C = 26 (probable = 12, défini = 3)	ELISA	AMS-C = 0,241 ± 0,143	Augmenté			
AMS-P = 0,244 ± 0,224								
Petzold et al., 2009 <sup>153</sup>	Initial = 42 6 mois = 32 12 mois = 20	ELISA	Initial = 0,25	Pas de comparaison	Pas de comparaison	Pas de comparaison	Pas de comparaison	
			6 mois = 0,36					
			12 mois = 0,41					

NB:\*AMS+PSP+DCL vs. MPI. \*\* AMS vs. MPI et MPI-D. \*\*\* AMS vs. DCL. \*\*\*\* AMS vs. DCB. ☒ AMS vs. PSP. AMS = Atrophie Multisystématisée (AMS-P = AMS forme parkinsonienne ; AMS-C = AMS forme cérébelleuse). ELISA = méthode immunoenzymatique sur support solide. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique. NFH = Fraction Légère du Neurofilament. NFL = Fraction Légère du Neurofilament. SPKA = Syndromes Parkinsoniens Atypiques.

### Neuron Specific Enolase : NSE

Un dernier marqueur de la dégénérescence neuronale a été brièvement étudié : il s'agit du Neuron Specific Enolase (NSE). Le NSE est une enzyme présente en haute concentration dans les neurones, les tissus neuroendocrines et aussi dans les tumeurs d'origine neuroendocrinienne. Il est donc utilisé en routine clinique comme biomarqueur des cancers pulmonaires à petites cellules et des neuroblastomes. Alors qu'il ne semble pas y avoir de différence entre AMS et sujets contrôles ni entre AMS-P et AMS-C,<sup>151</sup> le NSE pourrait être plus élevé chez les AMS que chez les MPI.<sup>135</sup> Il n'est nullement fait mention dans ces études d'une comparaison au taux plasmatique, ni d'un rapport taux dans le LCR/taux plasmatique. De nombreuses affections peuvent être responsables d'une augmentation du NSE dans le LCR : infarctus cérébraux, hématomes intra parenchymateux cérébraux, encéphalomyélite aiguë disséminée, etc.

### *b) Gliale*

#### Myelin Basic protein

La Myelin Basic Protein (MBP) est une protéine entrant dans la constitution de la myéline du système nerveux central, notamment dans son maintien via une interaction avec les lipides. Elle semblerait augmentée chez les AMS par rapport aux contrôles<sup>151</sup> et aux MPI<sup>135</sup> sans différence significative entre AMS-P et AMS-C.<sup>135,151</sup>

#### Protéine S100B

La même équipe a étudié la protéine S100B, protéine exclusive de la glie et plus précisément d'un certain type d'astrocytes péri-vasculaires. Ils n'ont pas trouvé de différence que ce soit entre AMS et contrôles,<sup>135,151</sup> entre AMS et MPI<sup>135</sup> ou entre AMS-P et AMS-C.<sup>135,151</sup>

### **3. Autres candidats biomarqueurs : en lien avec des structures spécifiques**

#### Hypocrétine

L'hypocrétine a été testée en raison d'un temps de sommeil excessif chez les patients atteints d'AMS ; mais aucun résultat n'est significatif en comparaison aux sujets contrôles, malgré deux études.<sup>155,156</sup>

#### Métabolites des neurotransmetteurs

Les métabolites des neurotransmetteurs ont été explorés très tôt, bien avant l'ensemble des molécules déjà vues.<sup>157</sup> Les principaux résultats sont les suivants (cf. tableau 13) :

- Les éléments composant le cycle de la dopamine ont bien sûr été testés en raison de leurs liens étroits avec la symptomatologie de l'AMS. Les principaux résultats proviennent d'une équipe états-unienne<sup>158</sup> qui a mené une étude à la fois en biochimie et en imagerie pour rechercher un déficit central en dopamine. Les résultats biologiques qui nous intéressent retrouvaient une

dopamine comparable entre AMS, MPI et contrôles. En revanche, la DOPA (précurseur de la dopamine par action de la dopa décarboxylase) ainsi que l'acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC ; métabolite déaminé de la dopamine cytosolique par la monoamine oxydase A, métabolite neuronal principal de la dopamine) dans le LCR étaient diminués chez les MPI et les AMS par rapport aux contrôles. Plus tard,<sup>159</sup> cette diminution de DOPA et DOPAC dans le LCR des patients AMS par rapport aux contrôles a été confirmée. En revanche, les dosages de ces différents éléments dans le plasma n'ont pas permis de détecter une quelconque différence comme lors de la première étude. L'acide homovanillique (HVA), dernier métabolite de la dopamine, a été retrouvé diminué chez les AMS par rapport aux contrôles,<sup>151</sup> chez les AMS-P par rapport aux MPI<sup>150</sup> mais pas chez les AMS tout venant par rapport aux MPI,<sup>135</sup> ni entre AMS-P et AMS-C.<sup>135,151</sup>

- L'acide 5-hydroxy-indolacétique (5HIAA) est le métabolite principal de la sérotonine. Il a montré un taux plus bas chez les AMS que chez les contrôles<sup>151</sup> et chez les AMS<sup>135</sup> et AMS-P<sup>150</sup> que chez les MPI, sans différence entre AMS-P et AMS-C.<sup>135,151</sup>
- Par ailleurs, les patients MPI avec hypotension orthostatique présentaient un taux plasmatique de dihydroxyphénylglycine (DHPG, principal métabolite neuronal de la norépinéphrine) et de norépinéphrine plus bas que les patients affectés par l'AMS.<sup>158</sup> Plus tard, la diminution dans le LCR de la DHPG a été confirmée, mais sans diminution de la norépinéphrine et sans différence significative entre AMS et MPI.<sup>159</sup>
- Le 3-méthoxy-4-hydroxyphényléthylène glycol (MHPG), métabolite noradrénergique, semblerait diminué chez les AMS par rapport aux contrôles<sup>151</sup> et aux MPI<sup>135</sup> et chez les AMS-P par rapport aux MPI et aux contrôles,<sup>150</sup> sans différence entre AMS-P et AMS-C.<sup>135,151</sup>
- Une autre étude de l'équipe de Goldstein a retrouvé un résultat intéressant : le taux dans le LCR de noradrénaline et de DHPG (son métabolite) était diminué chez les sujets AMS avec hypotension orthostatique mais comparable aux contrôles chez les sujets AMS sans hypotension orthostatique. Chez les sujets avec dysautonomie primitive (PAF), le taux dans le LCR mais aussi celui dans le sang artériel étaient plus bas que les sujets AMS avec hypotension orthostatique.<sup>160</sup> Cette comparaison a également été faite sur les taux plasmatiques, retrouvant un profil différent selon l'affection : les PAF avaient un taux plasmatique abaissé de catécholamines (norépinéphrine, épinéphrine, DHPG) et de métanéphrines (métanéphrine, normétanéphrine), les MPI avec hypotension orthostatique un taux abaissé de normétanéphrine et de DHPG abaissé, un taux normal d'épinéphrine et norépinéphrine et métanéphrine, les taux étant tous normaux chez les sujets AMS avec hypotension orthostatiques et les sujets contrôles (volontaires sains, MPI sans hypotension orthostatique).<sup>161</sup>



**Tableau 13 Neurotransmetteurs et leurs métabolites dans le LCR**

Biomarqueurs	Etudes	AMS vs. contrôles	AMS vs. MPI	AMS-P vs. AMS-C
DOPA	Goldstein et al., 2008 <sup>158</sup>	Diminué	Pas de différence	
	Goldstein et al., 2012 <sup>159</sup>	Diminué	Pas de différence	
DOPAC	Goldstein et al., 2008 <sup>158</sup>	Diminué	Pas de différence	
	Goldstein et al., 2012 <sup>159</sup>	Diminué	Pas de différence	
DHPG	Goldstein et al., 2008 <sup>158</sup>	Diminué	Pas de différence	
	Goldstein et al., 2012 <sup>159</sup>	Diminué	Pas de différence	
5-HIAA	Abdo et al., 2004 <sup>135</sup>		Pas de différence	Pas de différence
	Abdo et al., 2007 <sup>150</sup>		Diminué	
	Abdo et al., 2007 <sup>151</sup>	Diminué		Pas de différence
HVA	Abdo et al., 2004 <sup>135</sup>		Pas de différence	Pas de différence
	Abdo et al., 2007 <sup>150</sup>		Diminué	
	Abdo et al., 2007 <sup>151</sup>	Diminué		Pas de différence
MHPG	Abdo et al., 2004 <sup>135</sup>		Diminué	Pas de différence
	Abdo et al., 2007 <sup>150</sup>	Diminué	Diminué	
	Abdo et al., 2007 <sup>151</sup>	Diminué		Pas de différence

**NB : AMS = Atrophie multisystématisée (AMS-P = AMS forme parkinsonienne ; AMS-C = AMS forme cérébelleuse). DHPG = dihydroxyphénylglycine. DOPAC = acide dihydroxyphénylacétique. 5-HIAA = acide 5-hydroxy-indolacétique. HVA = Acide Homo Vanillique. MHPG = 3-méthoxy-4-hydroxyphényléthylène glycol. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique.**

Pour mémoire, nous citons d'anciennes études qui s'étaient intéressées au sujet mais dont nous ne retiendrons pas les résultats pour des raisons méthodologiques principalement: critères diagnostiques différents (diagnostics de Syndrome de Shy-Drager et Atrophie Olivo-Ponto-Cérébelleuses et Dégénérescence Nigrostriatale, et non pas AMS), méthodes de dosage différentes, taille des échantillons, etc. :

- Taux abaissé dans le LCR du 5-HIAA et du HVA chez les atrophies olivopontocérébelleuses et les syndromes de Shy-Drager.<sup>162</sup>
- Sur un échantillon de taille conséquente (n=33), le taux d'HVA et de 5-HIAA étaient significativement plus bas que chez les contrôles et les patients porteurs d'une PAF. Les patients avec syndrome parkinsonien le plus sévère présentaient un taux plus bas d'HVA que ceux avec syndrome parkinsonien modéré ou absent.<sup>157</sup>

- Taux significativement plus bas du HVA chez les dégénérescences nigrostriatales résistants à la lévodopa que chez les MPI.<sup>163</sup>
- Taux normal chez les AMS mais abaissé chez les PAF de DOPA, DOPAC, DHPG et norépinéphrine.<sup>164</sup>
- Pas d'abstract disponible.<sup>165</sup>
- Taux abaissé de l'épinéphrine, du neuropeptide Y et du MHPG chez les AMS par rapport aux contrôles.<sup>166</sup>
- L'activité plasmatique de la monoamine oxydase de type B était similaire entre les MPI non traités, les MPI traités, les AMS et les contrôles.<sup>167</sup>

Deux autres neurotransmetteurs, l'acide gamma aminobutyrique<sup>168</sup> et aussi le glutamate<sup>169</sup> ont été également étudiés, sans résultat concluant.

#### **4. Autres candidats biomarqueurs : sans lien avec une structure spécifique**

Enfin, un certain nombre de protéines a été brièvement étudié mais la recherche n'a pas été poussée plus avant en raison de leur faible potentiel en tant que candidats biomarqueurs. Nous les citerons simplement pour mémoire là aussi :

- L'acétylcholinestérase.<sup>170,171</sup>
- Le cofacteur de l'hydroxylase.<sup>172</sup>
- La glutamate déshydrogénase.<sup>173-177</sup>
- La ferritine.<sup>178</sup>
- L-glutamate, L-arginine et L-citrulline.<sup>179</sup>
- Les éléments simples du LCR ont aussi été analysés : leucocytes, glucose, protéinorachie, rapport albumine LCR/plasma qui est le témoin du bon fonctionnement de la barrière hémato-méningée... Les résultats sont le plus souvent non contributifs, et parfois contradictoires ; nous ne les aborderons donc pas ici.

## V- Description du protocole BIOAMS

### a. Introduction

Comme nous l'avons vu ci-dessus, le besoin d'un marqueur biologique à visée diagnostique et marqueur de la neurodégénérescence de l'AMS est grand et insatisfait. Sur la base des hypothèses physiopathologiques actuelles, l' $\alpha$ -synucléine et notamment sa forme oligomérique semblent jouer un rôle clé dans la cascade menant aux lésions et donc aux symptômes de l'AMS. Si l' $\alpha$ -synucléine totale dans le LCR semble bien départager les patients des sujets contrôles ou d'autres types de maladies (DTA), elle ne permet pas, à ce jour, de différencier MPI et AMS et autres syndromes parkinsoniens atypiques, qu'ils appartiennent aux synucléinopathies (DCL) ou non (PSP, DCB). La forme oligomérique de l' $\alpha$ -synucléine étant suspecte d'être la forme la plus toxique, elle paraît être d'autant plus intéressante à étudier. Si elle a été retrouvée augmentée chez les sujets porteurs d'une MPI par rapport aux contrôles<sup>117,180</sup> et aux tauopathies (PSP et DTA),<sup>180</sup> elle n'a été que très peu étudiée chez les AMS. Seule l'étude vue ci-dessus de Foulds et collaborateurs<sup>108</sup> l'a analysé, pour un résultat retrouvé comme non significatif bien que le taux dosé soit plus élevé chez les AMS que les autres patients. Cependant, cette étude ne comportant que 8 sujets AMS, sa puissance peut être prise à défaut. Le dosage de la forme oligomérique de l' $\alpha$ -synucléine dans le LCR de patients AMS semble donc intéressant à mener.

### b. Objectifs

Le protocole BIOAMS a été conçu avec pour objectif principal de comparer la concentration d' $\alpha$ -synucléine oligomérique dans le LCR chez les patients atteints d'une AMS versus un groupe contrôle de sujets dépourvus de pathologie neurodégénérative. Les objectifs secondaires étant de (i) comparer la concentration d' $\alpha$ -synucléine totale et l'index d' $\alpha$ -synucléine oligomérique/totale chez les patients atteints d'une AMS versus un groupe contrôle, (ii) étudier la corrélation entre les concentrations plasmatiques et dans le LCR de l' $\alpha$ -synucléine totale et oligomérique, (iii) étudier l'association entre les taux d' $\alpha$ -synucléine et la durée de l'AMS et l'âge des patients.

L'inclusion des témoins est en cours. Nous présenterons donc ci-dessous la méthodologie et le résultat d'échantillonnage des cas, sans les résultats des analyses biologiques qui seront réalisées simultanément sur l'ensemble des prélèvements lorsque tous les sujets auront été inclus, de sorte à réduire au maximum tout facteur de variabilité potentiel.

### **c. Méthodes**

Il s'agit d'une étude monocentrique cas-témoins comparative des taux d'alpha-synucléine dans le LCR et le plasma entre les patients AMS et un groupe témoin de patients non atteints de pathologie neurodégénérative. La durée prévue de l'étude était de 24 mois.

#### Patients et contrôles

La population cible est l'ensemble des patients atteints d'une AMS. La population source est constituée d'une cohorte établie et parfaitement caractérisée sur le plan clinique de 80 patients du centre de référence Atrophie Multisystématisée du CHU de Bordeaux. Les critères d'inclusions sont un diagnostic d'AMS « probable » selon les critères consensuels,<sup>31</sup> chez des hommes ou des femmes âgés de 30 ans ou plus et affiliés à un régime de sécurité sociale. Les témoins doivent être des hommes ou des femmes, appariés en sexe et en âge aux cas, non atteints de pathologie neurodégénérative et nécessitant une ponction lombaire, affiliés à un régime de sécurité sociale. Les critères d'exclusions sont un score UMSARS IV >4 points pour les patients AMS, et pour les deux groupes une incapacité à donner son consentement éclairé, une mesure de protection juridique en cours (sauvegarde de justice, tutelle ou curatelle).

#### Caractérisation clinique des patients

Les patients sont évalués par la réalisation des échelles UMSARS (cf. annexe I : UMSARS I = atteinte fonctionnelle des activités de la vie quotidienne, maximum = 48 ; UMSARS II = atteinte motrice, maximum = 56 ; UMSARS III = recherche d'hypotension orthostatique ; UMSARS IV = échelle d'invalidité, maximum = 5 ; UMSARS total = somme des parties I + II , maximum = 104) et QoL-AMS, le même jour que les prélèvements, ainsi qu'une évaluation cognitive (Montréal Cognitive Assessment = MoCA), des symptômes dépressifs (Beck Depression Inventory = BDI, maximum = 63), du sommeil (échelle d'Epworth, index de Qualité du Sommeil de Pittsburg (PSQI, maximum = 21), échelle de sévérité de la fatigue (FSS, maximum= 70)).

#### Prélèvements biologiques

Les prélèvements biologiques consistent en :

- une ponction lombaire (espaces intervertébraux L3-L4 ou L4-L5), dans la matinée entre 8h et 12h, à jeun, au moyen d'une aiguille Pajunk® de calibre 22 GA. Le premier tube prélevé (1ml) était envoyé en laboratoire pour comptage des érythrocytes au moyen d'une cytométrie de flux. Il est ensuite prélevé 15 ml de LCR dans un tube en polypropylène, acheminé en moins de 30 minutes au laboratoire pour centrifugation (2000 x g à température ambiante pendant 10 minutes), aliquotage en 10 échantillons dans des tubes en polypropylène, puis congélation et stockage à -80°C.

- Une ponction veineuse réalisée au bras par des infirmières expérimentées, dans un délai ne dépassant pas 60 minutes avant ou après la réalisation de la ponction lombaire. Vingt-cinq ml de sang sont prélevés (10 ml pour plasma, 10 ml pour sérum et 5 ml pour sang total). La qualité des prélèvements est vérifiée par dosage de l'hémoglobine libre. Les prélèvements pour la conservation de plasma et du sérum sont centrifugés (1500 x g pendant 15 minutes à 4°C), puis aliquotés par 1.5 ml dans des tubes de 2 ml avant d'être congelés. Le tube contenant du sang total est directement congelé.
- Dix ml d'urine en milieu de jet sont prélevés, centrifugés (2500 x g à 4°C pendant 15 minutes), aliquotés en tubes par 1,5 ml et congelés.

### Techniques de dosage

Les techniques de dosages de l' $\alpha$ -synucléine, aussi bien totale qu'oligomérique, dans le LCR ou plasmatiques, sont similaires à celles décrites précédemment par Tokuda et associés.<sup>180</sup> Les concentrations d' $\alpha$ -synucléine totale dans les échantillons sont mesurées en utilisant la technique ELISA.

La microplaque ELISA est coatée avec 1 $\mu$ g/ml de l'anticorps monoclonal dirigé contre l' $\alpha$ -synucléine humaine mAb211 (Santa Cruz Biotechnology, CA) (100  $\mu$ l/puit) dans 200 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6. Après lavage, 100  $\mu$ l de LCR sont ensuite ajoutés dans chaque puits et incubés à 37°C pendant 3 heures. La protéine  $\alpha$ -synucléine capturée est détectée par ajout de 0,2  $\mu$ g/ml de l'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l' $\alpha$ -synucléine humaine FL-140 (Santa Cruz Biotechnology, Californie) (100  $\mu$ l/puit), suivi de l'ajout d'un anticorps anti-lapin couplé au marqueur de l'horseradish peroxydase (HRP) (100  $\mu$ l/puit, dilution 1 :10000). L'activité HRP est alors révélée avec une solution de révélation (Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce). La chimiluminescence est mesurée grâce à un lecteur de microplaque. La courbe standard pour l'ELISA est réalisée avec une gamme de dilution d' $\alpha$ -synucléine recombinante pour chaque plaque. Tous les échantillons de chaque groupe sont mesurés en triplicat sur une même plaque avec les standards. La concentration relative d' $\alpha$ -synucléine totale est calculée à l'aide de la courbe standard. Pour la détection de l' $\alpha$ -synucléine oligomérique, l'anticorps mAb211 est remplacé par l'anticorps dirigé contre les formes oligomériques A11 (1 :1000 ; Invitrogen).

### ***Détection de l' $\alpha$ -synucléine oligomérique par dépôt de protéines sur matrice solide (Filter Retardation Assay)***

Les protéines présentes dans 500 $\mu$ l d'échantillon de LCR sont précipitées avec 20% d'acide trichloroacétique, lavées avec 6 volumes d'acétone froid, dissoutes dans un tampon de lyse (6mmol/l urée, 2% SDS, 10% glycérol, 62,5 mmol/l Tris pH 6,8), auquel 200 $\mu$ l de tampon de migration (25 mmol/l Tris-Cl Base, 200 mmol/l glycine, SDS 1%) sont ajoutés. La totalité de l'extrait protéique est ensuite déposée en double sur une membrane de cellulose-acétate 0,2  $\mu$ m (Membrane filter *Schleicher*

& Schuell) et sur une membrane de nitrocellulose 0,2  $\mu\text{m}$  (Optitran BA-S 83 *Schleicher & Schuell*) en utilisant l'appareillage *Minifold-1 Dot-Blot System Schleicher & Schuell*. Les membranes sont lavées avec du tampon de migration 0,1X, puis rincées au PBS. Les deux membranes sont traitées selon la procédure d'immunotransfert. Les anticorps primaires utilisés sont les anticorps monoclonaux dirigés contre l'alpha-synucléine humaine mAb211 (1 :1000 ; Santa Cruz Biotechnology, CA / 1 :1000 ; BD Biosciences Transduction Laboratories), l'anticorps polyclonal reconnaissant les formes oligomériques A11 (1 :1000 ; Invitrogen) et l'anticorps monoclonal dirigé contre l'alpha-synucléine phosphorylée en position 129 (1 :1000 ; Wako).

#### Analyse statistique

L'analyse statistique consiste en une comparaison de moyennes entre les deux groupes par un test t de Student des différents marqueurs. Une mesure de corrélation entre la concentration plasmatique et la concentration du LCR est faite par un calcul de coefficient de corrélation intra-classe. Le nombre de sujets nécessaires calculé a priori est de 20 patients AMS et 20 témoins avec pour hypothèses un risque alpha de 5%, une puissance de 80%, un doublement du taux de 8000 à 16000 RLU/s avec des écarts-types de 2000 et 11000 respectivement.

#### **d. Résultats**

La première inclusion a eu lieu le 26 novembre 2012, le recrutement des cas mais surtout des témoins est toujours en cours. Nous avons recruté 22 sujets AMS mais deux ont été exclus en raison de l'impossibilité technique de réaliser la ponction lombaire ; sur les 20 restants, 9 étaient des femmes (45%) et 11 des hommes (55%). Les formes parkinsoniennes (AMS-P) sont discrètement surreprésentées (11/20 soit 55%), l'âge moyen est de  $63,8 \pm 7,6$  ans. La durée moyenne d'évolution est de  $6,9 \pm 3,23$  ans, médiane à 6 ans. L'évaluation de la sévérité de la maladie retrouve un score UMSARS II moyen de  $25,8 \pm 9,1$ , UMSARS I moyen de  $23,4 \pm 9,1$ , UMSARS IV moyen de  $2,7 \pm 1,1$  pour un UMSARS total moyen de  $49,1 \pm 17,4$ . La moyenne à la QoL-AMS est de  $69,1 \pm 23,6$ . L'Epworth moyen est  $7,6 \pm 3,9$ , avec 6 patients (27%) présentant un score supérieur au seuil pathologique ( $\geq 11$ ). Le score moyen à la PSQI est de  $6,1 \pm 3,7$ . La FSS moyenne est de  $38,7 \pm 16,7$ , 12 patients (55%) présentaient un score pathologique  $\geq 36/70$ . Le score moyen à la MoCA est de  $22,20 \pm 3,37$ . Parmi les 22 patients, 9 (41%) avaient un score pathologique à la BDI (si l'on retient le seuil utilisé dans la MPI qui est de  $>14/63$ ).

En raison de la présence physiologique d' $\alpha$ -synucléine dans les érythrocytes, nous procéderons à l'exclusion de l'analyse des prélèvements les plus fortement contaminés par le sang (soit les prélèvements avec plus de 50 érythrocytes /  $\text{mm}^3$ ), concernant 6 sujets. En excluant ces prélèvements, la contamination moyenne est de 2,5 érythrocytes/ $\text{mm}^3$ .

A l'heure actuelle, 3 contrôles ont accepté de participer à l'étude. Nous n'avons donc pas pu procéder aux analyses biologiques, qui seront centralisées et réalisées prochainement au cours d'une seule et même manipulation.

#### e. Discussion concernant le protocole BIOAMS

La nécessité d'un biomarqueur de l'atrophie multisystématisée est aujourd'hui un besoin urgent et non résolu, aussi bien pour un intérêt diagnostique, pronostique que pour la recherche d'un traitement neuroprotecteur. L' $\alpha$ -synucléine oligomérique, de par son implication physiopathologique majeure et de par la possibilité de la doser dans les liquides biologiques, notamment le LCR, semble être un excellent candidat biomarqueur. Seule une étude a pu en réaliser le dosage, sans résultat probant, mais la faiblesse de l'effectif (8 sujets AMS) ne permet pas d'écarter cette piste.<sup>108</sup>

Notre échantillon est de taille modeste, d'autant plus que la contamination sanguine (> 50 érythrocytes/mm<sup>3</sup>) de 6 prélèvements amène par prudence à leur exclusion pour au moins une partie des analyses. Cette exclusion permet de s'affranchir d'un éventuel facteur confondant, même si l'importance de la corrélation entre la contamination sanguine et la variation du taux d' $\alpha$ -synucléine reste sujet à débat ; en effet, les premières données retrouvaient une concentration d' $\alpha$ -synucléine dans le sang très supérieure à celle du LCR<sup>181</sup>, mais les plus récentes analyses ne retrouvent une corrélation que faible entre la contamination sanguine et le taux d' $\alpha$ -synucléine,<sup>105,182</sup> qui ne serait affecté que lorsque la contamination est très importante, au-delà de 1000ng/ml d'hémoglobine.<sup>182</sup> Contrairement à l'étude de Foulds et associés dont la technique ne la détectait pas, il a déjà été possible de doser la forme oligomérique de l' $\alpha$ -synucléine dans le sang (chez des sujets MPI).<sup>180</sup> Il nous paraît néanmoins plus prudent pour la robustesse du résultat de BIOAMS d'exclure les prélèvements à forte contamination sanguine. Cette exclusion mène à une diminution du nombre de sujets ; il reste néanmoins la possibilité de recruter de nouveaux patients, de sorte à atteindre le nombre de sujets nécessaire déterminé *a priori* pour que la puissance de l'étude soit atteinte. Une autre limite de BIOAMS, mais qui est commune à l'immense majorité des études sus-citées, reste l'absence de confirmation anatomopathologique du diagnostic. Un patient décédé a néanmoins été confirmé en anatomopathologie comme porteur d'une AMS.

La caractérisation clinique des patients de BIOAMS a été la plus exhaustive possible, aussi bien sur le plan moteur que des symptômes non moteurs. La durée moyenne d'évolution représente un échantillon de patients relativement avancés dans la maladie si on la situe par rapport à la durée de survie médiane de 9,8 ans en Europe des patients AMS<sup>3</sup> contre 6 dans cet échantillon, et comme le témoigne la survenue de quatre décès parmi nos patients. L'altération de la qualité de vie est sévère également, la moyenne de QoL-AMS étant plus élevée que celle retrouvée précédemment sur une cohorte française (45,7  $\pm$  18,9),<sup>183</sup> mais cette dernière incluait des sujets dont la durée moyenne d'évolution de la

maladie était plus courte, ceci pouvant expliquer cette différence. Les autres paramètres cliniques sont relativement sévères, mais sur la majorité des scores cliniques disponibles, l'échantillon de patients est proche des patients affectés par cette maladie en Europe.<sup>3</sup> Le recrutement des témoins appariés en âge et en sexe n'a pas pu être réalisé dans son intégralité. Nous sommes donc en attente de la fin de l'inclusion de ceux-ci pour pouvoir procéder aux dosages simultanés sur tous les échantillons, de sorte à réduire les facteurs de variabilité potentiels. Un autre intérêt de cette étude sera, à terme et grâce au prélèvement standardisé similaire à une étude américaine, la possibilité de comparer le LCR de ces patients AMS aux sujets porteurs d'une MPI. L'ensemble des prélèvements s'est déroulé sans survenu d'évènement indésirable, il n'y a notamment pas eu de complication aux ponctions lombaires. Cela conforte l'idée qu'il s'agit d'un prélèvement acceptable pour les patients, malgré son caractère invasif.

Ainsi, l' $\alpha$ -synucléine oligomérique reste parmi les candidats biomarqueurs de l'AMS, notamment en raison de son implication physiopathologique majeure. Nous sommes en attente de son dosage dans les liquides biologiques de l'échantillon de patients pour BIOAMS, échantillon semble-t-il représentatif de la population cible. L'inclusion des témoins encore nécessaires se poursuit et les dosages seront réalisés prochainement.



## VI- Discussion et perspectives

### a. Synthèse de la littérature

#### L' $\alpha$ -synucléine : cible principale des recherches actuelles

Notre travail portait principalement sur l' $\alpha$ -synucléine ; celle-ci est la cible principale des recherches en raison de son implication majeure dans la physiopathologie de l'AMS. Si l' $\alpha$ -synucléine totale dans le LCR semble diminuée en comparaison des sujets contrôles, elle ne permettrait pas de différencier AMS et MPI. Sa forme phosphorylée en position Sérine 129 (PS-129) pourrait être plus pertinente pour les différencier, mais les résultats doivent être reproduits par d'autres équipes pour être confirmés. L'étude de Foulds et collaborateurs a bien retrouvé une forme oligomérique et phosphorylée en position Sérine 129 (oligo-PS-129) augmentée, mais ce résultat reste isolé, et la validité externe de cette étude est fortement remise en question par la différence majeure du taux de l' $\alpha$ -synucléine totale par rapport au reste de la littérature. Cette étude contournait néanmoins un biais majeur de l'ensemble des études vues ci-dessus : le diagnostic des sujets était anatomopathologique, alors que l'ensemble de la littérature est très largement dominée par des diagnostics cliniques donc toujours sujets au risque d'erreur. Cependant, comme ce fut le cas pour BIOAMS, ce risque d'erreur diagnostique semble être minimisé par le recours à un centre spécialisé dans les mouvements anormaux, l'étude la plus importante retrouvant une valeur prédictive positive de 85% et une spécificité de 95% pour le diagnostic clinique d'AMS.<sup>184</sup> Concernant la forme oligomérique de l' $\alpha$ -synucléine, pivot des mécanismes physiopathologiques connus à ce jour, trop peu d'études sont disponibles. Seul Foulds et collaborateurs l'ont dosé chez des sujets AMS,<sup>108</sup> sans résultat convaincant, mais avec un échantillon très modeste. Les résultats à venir du protocole BIOAMS nous paraissent donc d'autant plus importants. Un autre intérêt du protocole BIOAMS est que les prélèvements et l'analyse ont été réalisés de manière superposable à une autre étude qui les réalise chez les patients porteurs d'une MPI (Parkinson's Progression Markers Initiative – PPMI promue par la Michael J Fox Association), ce qui permettra de comparer les sujets AMS et MPI lorsque les prélèvements de ceux-ci seront disponibles. Les études portant sur le dosage sanguin de l' $\alpha$ -synucléine ne sont pas assez nombreuses et concordantes pour être satisfaisantes, et surtout la reproductibilité des résultats est encore trop faible pour pouvoir être appliquée à grande échelle.

#### Autres candidats biomarqueurs : reflets de différences physiopathologiques avec la MPI ?

L' $\alpha$ -synucléine n'étant pas seule à intervenir dans la cascade physiopathologique et la neurodégénérescence de l'AMS étant plus diffuse et agressive que dans la MPI, les autres candidats biomarqueurs pourraient être utiles. Les plus prometteurs semblent être les protéines du neurofilament, la fraction légère (NFL) et la fraction lourde (NFH) semblant être augmentées chez les AMS en comparaison des contrôles mais aussi des MPI, sans pour autant différencier AMS et autres SPKA.

Les métabolites des neurotransmetteurs ont bien été étudiés (DOPA, DOPAC, DHPG, 5HIAA, HVA) mais ne sont pas contributifs pour ce qui est de différencier MPI et AMS, à l'exception peut-être du MHPG qui a été le seul à reproduire une diminution significative. Seule la comparaison aux sujets contrôles retrouvait une diminution significative de ces neurotransmetteurs. Les marqueurs de la maladie d'Alzheimer apportent des résultats mitigés ; si tTAU semble être un bon candidat pour différencier AMS, MPI et contrôles puisque plusieurs études rapportent un taux plus élevé chez les AMS, ce n'est pas le cas pour les autres (pTAU, A- $\beta$ 42, A- $\beta$ 40, sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ ).

Une des voies de recherche majeure va être celle des miARNs. Leurs liens avec les mécanismes physiopathologiques sont encore très méconnus, mais leur rôle de reflet du fonctionnement cellulaire en fait une piste très prometteuse. La seule étude portant sur le sujet montre à ce propos des résultats encourageants puisqu'elle retrouve des différences de miARNs entre les pathologies. Elle nécessite néanmoins réplication.

Des résultats intéressants sont à noter : certains marqueurs du LCR comme DJ-1, UCHL-1, flt3-ligand, MBP, YKL-40, ou plasmatiques (TNF- $\alpha$ , le rapport 8-OHdG / 8-OHG), ou bien encore l'analyse du protéome dans le LCR et des polyamines, ont permis une séparation des sujets AMS et MPI avec des valeurs acceptables de sensibilité et de spécificité. Mais ces études manquent encore de reproductibilité. C'est notamment le cas DJ-1, qui semble intéressant puisque potentiellement en lien avec la physiopathologie. Mais les résultats sont encore contradictoires et surtout les techniques différentes semblent mener à des taux très différents. Malgré l'utilisation d'une seule et même technique, les résultats ont été très différents pour le Flt3 ligand.<sup>103,133</sup> Tout ceci montre bien la nécessité de répliquer les études car les conclusions peuvent être très différentes. L'ubiquitine a différencié SPKA et MPI dans une étude, mais pas AMS vs. MPI isolément.

En revanche, plusieurs pistes semblent pouvoir être écartées : les éléments « basiques » du LCR (protéinorachie, leucocytes, lactates, pyruvate, urate, etc.), fractalkine, protéine S100-B, GFAP, sCD14, le glutathion, NSE, hypocrétine. L'analyse de l'état de la barrière hémato-encéphalique par le rapport albumine du LCR/albumine plasmatique a apporté certains résultats intéressants, mais semble peu spécifique car de trop nombreux facteurs peuvent interférer avec cette analyse.

Aucun de tous ces candidats biomarqueurs pris isolément vus ci-dessus n'a permis de retrouver des résultats constants et fiables pour ce qui est de différencier l'AMS de la MPI et des autres syndromes parkinsoniens, ni pour ce qui est d'être marqueur de l'évolution ou de la gravité de la maladie.

## **b. Analyse des échecs**

Comme l'a récemment dit Mollenhauer, une des limites principales des différentes études que nous avons vues et concernant le sujet aussi bien chez les patients AMS que MPI ou DCL est le manque de confirmation anatomopathologique du diagnostic retenu.<sup>116</sup>

Une des autres limites relevée par cette même chercheuse est le fait que nous ne savons que très peu sur les facteurs pouvant influencer sur le taux d' $\alpha$ -synucléine : quid des effets du rythme circadien ? Des traitements dopaminergiques ? Des autres médicaments ? Etc.

Parallèlement, les techniques de dosages devront être améliorées et surtout standardisées, puisque les taux retrouvés selon les équipes de recherche peuvent être très différents : l' $\alpha$ -synucléine varie de 0,1 à 56 ng/ml de moyenne, soit un facteur supérieur à 500 entre les deux extrêmes (ceci en excluant l'étude de Foulds et collaborateurs, qui trouvaient eux un taux à 3800ng/ml). L'essentiel des études retrouvent un taux total d' $\alpha$ -synucléine entre 0,1 et 1,5 ; mais les écarts restent trop importants pour les considérer comme applicables en pratique clinique de routine. Un autre élément pouvant expliquer les différences de taux entre les études est l'utilisation d'anticorps différents pour les ELISA selon le laboratoire ; des anticorps différents, reconnaissant des épitopes différents, peuvent amener à des différences de résultats non négligeables. Sans aborder le sujet du moment de la journée où la ponction lombaire est réalisée, le délai de centrifugation et congélation, et surtout le taux d'hémoglobine accepté qui est un des principaux facteurs interférant avec le taux d' $\alpha$ -synucléine du LCR.

Des nouvelles techniques de dosages sont mises au point, notamment la technique TR-FRET, qui pourraient apporter une simplicité et une rapidité de réalisation intéressantes pour la mise en pratique clinique. Celle-ci nécessite néanmoins un développement et une diffusion dans plusieurs équipes afin de pouvoir en tester la reproductibilité. A ce jour, il n'existe pas d'étude ayant utilisé cette technique chez des sujets AMS, mais seulement des MPI : le résultat allait dans le sens des autres études (diminution de l' $\alpha$ -synucléine par rapport aux témoins).<sup>118</sup>

Pour ce qui est d'identifier un marqueur de la dégénérescence neuronale, trop peu d'études encore se sont intéressées aux sujets qui se situent tôt dans l'évolution de la maladie, ou à un suivi longitudinal. Il est certain qu'organiser des ponctions lombaires itératives au cours du suivi évolutif reste compliqué, aussi bien d'un point de vue organisationnel qu'éthique, mais parvenir à doser de façon répétée le candidat biomarqueur chez des sujets évoluant sur plusieurs années reste la meilleure manière de déterminer si ce biomarqueur évolue parallèlement à la dégradation clinique et à l'avancée de la neurodégénérescence.

## c. Combinaison de biomarqueurs

Sur le modèle de la DTA,<sup>185,186</sup> il est unanimement reconnu qu'il sera nécessaire de recourir à une combinaison de biomarqueurs, et de manière assez précoce.<sup>116,135</sup> Cette combinaison peut se faire avec  $\alpha$ -synucléine (cf. tableau 14) ou sans  $\alpha$ -synucléine (cf. tableau 15). Nous présentons ci-dessous les associations nous paraissant les plus intéressantes, sur la base des connaissances physiopathologiques actuelles et des études disponibles. La liste n'est pas exhaustive.

### 1. Avec l' $\alpha$ -synucléine

Pour différencier AMS et MPI, Shi et collaborateurs<sup>103</sup> ont montré de relatives bonnes performances de l'association  $\alpha$ -synucléine et du rapport pTAU/tTAU. Toujours dans l'optique de différencier AMS et MPI, l'association  $\alpha$ -synucléine totale + PS-129 faisait mieux que PS-129 seule. Ces résultats ont été globalement confirmés sur la seconde cohorte.<sup>102</sup> Ces auteurs émettent également l'hypothèse qu'en l'associant à Flt3 ligand et la protéine tTAU, les performances diagnostiques pourraient être améliorées. Ces derniers résultats sont néanmoins à répliquer car la pertinence du Flt3 ligand est remise en cause.<sup>133</sup> Au cours d'une seule grande étude de 453 sujets dont 48 AMS,<sup>100</sup> il est montré que l'association de 5 biomarqueurs ( $\alpha$ -synucléine, tTAU, pTAU, A $\beta$ 42, NFL) permettait de différencier avec une grande acuité la MPI des SPKA (AMS, DCB, PSP). L'amélioration apportée par l'association de ces 5 protéines était non négligeable par rapport à l' $\alpha$ -synucléine seule puisque l'aire sous la courbe (AUC) passait de 0,6 à 0,93 ; en revanche, NFL seul permettait d'avoir approximativement les mêmes résultats et participait donc principalement à cette précision diagnostique.

On constate que, dans l'ensemble, l'association de plusieurs biomarqueurs améliore les valeurs de l'AUC (cf. tableau 14).

**Tableau 14** Combinaisons de biomarqueurs avec l' $\alpha$ -synucléine

Etudes	Biomarqueurs	AMS vs. contrôles			AMS vs. MPI			AMS vs. PSP			AMS vs. DTA		
		Se	Sp	AUC	Se	Sp	AUC	Se	Sp	AUC	Se	Sp	AUC
Shi et al., 2011 <sup>103</sup>	$\alpha$ -syn	94%	70%	0,88	91%	25%	0,72				95%	70%	0,92
	$\alpha$ -syn + pTAU/tTAU				90%	65%	0,85						
	$\alpha$ -syn + A- $\beta$ 42										95%	95%	0,99
Wang et al., 2012 <sup>102</sup> Cohorte 1 (pour Sp>80%)	$\alpha$ -syn	75%	86%	0,886	26%	88%	0,624	50%	87%	0,674			
	PS-129	29%	88%	0,638	64%	86%	0,771	29%	80%	0,550			
	$\alpha$ -syn + PS-129	75%	82%	0,886	40%	88%	0,709	63%	83%	0,792			
Wang et al., 2012 <sup>102</sup> Cohorte 2 (pour Sp>80% dans la cohorte 1)	$\alpha$ -syn + PS-129	81%	62%	0,834	47%	94%	0,769	50%	82%	0,742			
Herbert et al., 2014 <sup>106</sup>	$\alpha$ -syn + DJ-1 + tTAU + pTAU						0,92						

NB :  $\alpha$ -syn =  $\alpha$ -synucléine totale. AMS = atrophie multisystématisée. AUC = aire sous la courbe Receiver Operating Characteristic. DTA = Démence de type Alzheimer. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique. PS-129 = PS-129=  $\alpha$ -synucléine phosphorylée en sérine 129. PSP = Paralyse Supranucléaire Progressive. pTAU = protéine TAU phosphorylée. Se = sensibilité. Sp = spécificité. tTAU = protéine TAU totale.

## 2. Sans l' $\alpha$ -synucléine

Pour différencier AMS et contrôles, l'association DJ1 + pTAU/tTAU pouvait être utile (après exclusion des tubes à forte contamination sanguine, problème inhérent à la prise en compte de DJ-1).<sup>103</sup> Une autre étude a regardé la combinaison de tTAU, pTAU, DJ-1, retrouvant une meilleure acuité pour diagnostiquer l'AMS parmi des contrôles et des MPI.<sup>106</sup> L'association NFL + tTAU a permis d'avoir de très bonnes performances diagnostiques même si l'échantillon reste de petite taille.<sup>150</sup>

L'association de biomarqueurs nécessitera néanmoins la réplication des résultats pour les différents biomarqueurs isolément et associés, trop peu d'études concordantes sont à ce jour disponibles. Mais comme nous l'avons vu ci-dessus, l'association de plusieurs biomarqueurs permettrait sans doute d'améliorer les performances diagnostiques (cf. tableau 15).

**Tableau 15 Combinaisons de biomarqueurs sans l' $\alpha$ -synucléine**

Etudes	Biomarqueurs	AMS vs. contrôles			AMS vs. MPI			AMS vs. DTA		
		Se	Sp	AUC	Se	Sp	AUC	Se	Sp	AUC
Abdo et al., 2007 <sup>150</sup>	NFL				83%	90%	0,92			
	tTAU				76%	97%	0,88			
	NFL + tTAU				88%	87%	0,94			
Herbert et al., 2014 <sup>106</sup>	DJ-1	78%	100%	0,94	78%	78%	0,84			
	DJ-1 + tTAU + pTAU				82%	91%	0,92			
Shi et al., 2011 <sup>103</sup>	DJ-1	94%	55%	0,85	92%	20%	0,67	90%	35%	0,83
	tTAU	90%	26%	0,77	90%	40%	0,70	92%	60%	0,89
	pTAU	90%	32%	0,68	90%	10%	0,57	92%	65%	0,90
	pTAU/tTAU	88%	21%	0,70	90%	40%	0,72	87%	30%	0,70
	DJ-1 + pTAU/tTAU	95%	70%	0,93						
Wang et al., 2011 <sup>138</sup>	C3	< 60%	< 60%		< 60%	< 60%		< 60%	< 60%	
	Facteur H	< 60%	< 60%		< 60%	< 60%		< 60%	< 60%	
	Ratio C3/Facteur H	85%	81%		80%	87%		70%	95%	

**NB : AMS = atrophie multisystématisée. AUC = aire sous la courbe Receiver Operating Characteristic. C3 = complément 3. DTA = Démence de type Alzheimer. MPI = Maladie de Parkinson Idiopathique. pTAU = protéine TAU phosphorylée. Se = sensibilité. Sp = spécificité. tTAU = protéine TAU totale.**

#### **d. Choix du marqueur biologique selon la problématique clinique**

Enfin, il pourrait également être évoqué l'hypothèse que le biomarqueur dosé pourrait être choisi en fonction de la question posée par le clinicien du diagnostic différentiel affiné. C'est-à-dire que le biomarqueur utilisé soit choisi en fonction de la situation clinique, en fonction du doute diagnostique du clinicien : selon que le doute diagnostique oscille entre une AMS et une PSP, ou alors entre une MPI et une AMS, etc., le biomarqueur utilisé pourrait être différent.

Par exemple, en situation clinique et à la vue des études présentées ci-dessus, les possibilités pourraient être :

- Si l'objectif est d'éliminer une AMS (AMS vs. contrôle), les meilleurs biomarqueurs pourraient être soit DJ-1 seul (Se = 78%, Sp = 100%, AUC = 0,94), éventuellement l'association DJ-1 + pTAU/tTAU (Se = 95%, Sp = 70%, AUC = 0,93) mais sa spécificité est moindre. L'utilité du Flt3-ligand seul (Se = 95%, Sp = 90%, AUC = 0,95) est remise en question car, même si la dernière étude disponible<sup>133</sup> ne compare pas les AMS aux contrôles comme dans la première,<sup>103</sup> la différence de résultats obtenus pour les autres comparaisons permettent de douter.
- Si la question posée est le diagnostic différentiel entre une AMS et une MPI, le meilleur candidat à l'heure actuelle serait l'association DJ-1 + tTAU + pTAU (Se = 82%, Sp = 91%, AUC = 0,92), ± avec l' $\alpha$ -synucléine (AUC = 0,92), ou le NFL (Se = 83%, Sp = 90%, AUC = 0,92) ou NFL + TAU (Se = 88%, Sp = 87%, AUC = 0,94). L'utilité du Flt3-ligand (Se = 99%, Sp = 95 %, AUC = 0,98) est à (re)démontrer car la dernière étude disponible<sup>133</sup> remet grandement en cause la première.<sup>103</sup>
- Pour différencier AMS et DTA (problème peu posé en pratique), la meilleure combinaison serait  $\alpha$ -synucléine + A- $\beta$ 42 (Se = 95%, Sp = 95%, AUC = 0,99). Le Flt3-ligand serait également très intéressant (Se= 95%, Sp= 90%, AUC = 0,95), mais le résultat reste à démontrer sur une autre cohorte pour les raisons vues ci-dessus.

Ainsi l'on voit que pour aider au diagnostic différentiel, adapter le biomarqueur pourrait être pertinent. Cela peut facilement se concevoir du point de vue physiopathologique : l'AMS (synucléinopathie) et la DTA (tauopathie, implication de l'A- $\beta$ 42 également) sont bien distinguées par ces deux éléments. En revanche, MPI et AMS partageant des mécanismes physiopathologiques très probablement proches, il faudrait peut-être avoir recours à des marqueurs autres que l' $\alpha$ -synucléine totale: marqueurs de la dégénérescence axonale (NFL, TAU) ? Molécules impliquées différemment dans ces deux maladies (Flt3-ligand ?) ? La piste de l' $\alpha$ -synucléine oligomérique prend ici tout son intérêt : la neurodégénérescence était plus intense et plus diffuse dans l'AMS, il s'agit possiblement d'une différence de taux d' $\alpha$ -synucléine oligomérique.



### **e. Perspectives de recherche**

Les données de l'implication physiopathologique de l' $\alpha$ -synucléine étant maintenant solides, celle-ci donne espoir d'aboutir à un marqueur biologique précis et fiable. Néanmoins, il faudra reproduire les études portant sur ses formes oligomériques et/ou phosphorylées, avec protocoles standardisés et cohortes plus larges. Il n'y a aucune étude portant sur la forme monomérique. Une autre voie fondamentale dans cette quête est l'harmonisation des techniques de dosages, celles-ci étant trop différentes selon les laboratoires pour pouvoir généraliser un quelconque résultat pour l'instant. Les connaissances manquent en ce qui concerne un éventuel cycle nyctéméral de l' $\alpha$ -synucléine, facteur pouvant jouer un rôle confondant non négligeable.

Une autre voie de recherche qui pourrait se révéler utile serait de déterminer quelles sont les différences physiopathologiques entre MPI et AMS. En effet, si l'on veut les différencier par des dosages biologiques, la mise en évidence de protéines différemment impliquées dans ces deux maladies et donc leur dosage chez les patients pourraient possiblement permettre de les différencier.

Dans tous les cas, la constitution de cohortes avec prélèvement du vivant du sujet puis confirmation anatomopathologique du sujet seraient extrêmement utiles.

## VII- Conclusion

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de marqueur biologique fiable et précis pour le diagnostic d'AMS, ni même pour la quantification de l'importance de la neurodégénérescence. Il existe plusieurs candidats biomarqueurs très intéressants pour la différenciation entre AMS, MPI et autres syndromes parkinsoniens dégénératifs. Pour ce qui est de graduer la neurodégénérescence, aucun d'eux n'est satisfaisant, les données sont trop parcellaires. Néanmoins, à la vue des mécanismes physiopathologiques et des premières études, l' $\alpha$ -synucléine et ses formes dérivées (phosphorylées, oligomériques...) semblent être les candidats les plus intéressants.

L' $\alpha$ -synucléine totale du LCR semble diminuée chez les sujets porteurs d'une AMS en comparaison des témoins et des DTA, mais ne permet pas de différencier les AMS des MPI, ni même des PSP, DCB et DCL. Les autres formes (oligomériques, phosphorylées, oligomériques et phosphorylées) du LCR voire du plasma de l' $\alpha$ -synucléine semblent intéressantes, mais le manque de reproductibilité des résultats ne permet pas aujourd'hui de conclure précisément. La grande variabilité des taux d' $\alpha$ -synucléine dans le LCR entre les études réalisées jusqu'ici n'autorise pas non plus de généraliser les résultats. De trop grandes différences méthodologiques existent encore selon les protocoles mis en place dans les études; une harmonisation des techniques entre les laboratoires, des échantillons plus importants, mais aussi une confirmation anatomopathologique - qui reste à l'heure actuelle l'« étalon-or » du diagnostic d'AMS - sont nécessaires pour améliorer les chances de mettre en évidence un marqueur sensible et spécifique de cette pathologie et qui reflète la sévérité de son atteinte.

Si l' $\alpha$ -synucléine semble être la piste la plus prometteuse, notamment pour ce qui est d'être le reflet de la neurodégénérescence en raison de son implication physiopathologique majeure, d'autres hypothèses sont intéressantes et à ne pas négliger. Une combinaison de plusieurs biomarqueurs, potentiellement variable selon les hypothèses diagnostiques et composée de l' $\alpha$ -synucléine (ou une des ses formes oligomérique et/ou phosphorylée) associée à d'autres protéines, sera certainement nécessaire pour faire aboutir cette recherche.

## VIII- Abréviations

$\alpha$ -syn: protéine alpha-synucléine

Oligo- $\alpha$ -syn: protéine alpha-synucléine oligomérique

Oligo-PS-129: protéine alpha-synucléine oligomérique et phosphorylée en position sérine 129

PS-129: protéine alpha-synucléine phosphorylée en position Sérine 129

AMS: Atrophie multisystématisée

AUC: Aire sous la Courbe (AUC pour Area Under Curve)

BBMA (= Bead-based Multianalyte Assay): technique multi-analytes basée sur des perles

CDL: Corps de Lewy

DCB: Démence Cortico Basale

DCL: Démence à Corps de Lewy

DTA: Démence de Type Alzheimer

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) : méthode immunoenzymatique (support solide)

IGC: Inclusions Gliales Cytoplasmiques

LCR : Liquide Céphalorachidien

MPI: Maladie de Parkinson Idiopathique

NFL : Chaîne légère du Neurofilament

NFH : Chaîne lourde du Neurofilament

PSP: Paralyse Supranucléaire Progressive

PAF: Dysautonomie Primitive (PAF pour Primary Autonomic Failure)

ROC: Receiver Operating Characteristic

SPKA: Syndromes Parkinsoniens Atypiques

TAU: protéine Tubule-Associated Unit

pTAU : Protéine TAU phosphorylée ; tTAU : protéine TAU totale

## IX- Annexes

### Annexe I : UMSARS

Wenning et al., 2004<sup>187</sup>

Coter la situation fonctionnelle moyenne au cours des deux dernières semaines passées (sauf précision) selon l'interrogatoire du patient et de l'aidant. Indiquer le score qui correspond le mieux à l'état du patient. Coter la fonction indépendamment de la nature des signes.

#### UMSARS I

<b>1) Parole</b>	<input type="checkbox"/>
0 = Non affectée	
1 = Légèrement affectée, pas de difficulté à être compris	
2 = Modérément affectée. Parfois (moins de la moitié du temps) lui demander de répéter les phrases	
3 = Sévèrement affectée. Fréquemment (plus de la moitié du temps) lui demander de répéter les phrases	
4 = Incompréhensible la plupart du temps	

<b>2) Déglutition</b>	<input type="checkbox"/>
0 = Normale	
1 = Légèrement perturbée. S'étouffe moins d'une fois par semaine	
2 = Modérément perturbée. Fausses routes occasionnelles avec étouffement plus d'une fois par semaine	
3 = Sévèrement perturbée. Fausses routes fréquentes	
4 = Nécessite une alimentation par sonde nasogastrique ou gastrostomie	

<b>3) Ecriture</b>	<input type="checkbox"/>
0 = Normale	
1 = Légèrement altérée. Tous les mots restent lisibles	
2 = Modérément altérée. Au moins la moitié des mots restent illisibles	
3 = Altération marquée. La majorité des mots sont illisibles	
4 = Incapable d'écrire	

**4) S'alimenter et manipuler les couverts** 

0 = Normal

1 = Un peu lent et/ou maladroit, mais n'a pas besoin d'aide

2 = Peut couper la plupart des aliments, quoique maladroit et lent ; aide partielle nécessaire

3 = La plupart des aliments doivent être coupés par quelqu'un, mais peut encore s'alimenter lentement

4 = On doit lui donner à manger

**5) Habillage** 

0 = Normal

1 = Un peu lent et/ou maladroit, mais n'a pas besoin d'aide

2 = Aide occasionnelle pour boutonner, enfiler une manche

3 = Aide considérable nécessaire, mais peut faire certaines choses tout seul

4 = Totalement dépendant

**6) Hygiène** 

0 = Normale

1 = Un peu lent et/ou maladroit, mais n'a pas besoin d'aide

2 = Nécessite une aide pour la douche ; ou très lent dans les soins hygiéniques

3 = Nécessite une aide pour se laver, pour se brosser les dents, se coiffer et utiliser les toilettes

4 = Totalement dépendant

**7) Marche** 

0 = Normale

1 = Légèrement altérée. N'a pas besoin d'aide. Pas d'aide à la marche (excepté pour d'autres troubles non liés à la maladie)

2 = Modérément altérée. Assistance et/ou aide occasionnelle à la marche

3 = Sévèrement altérée. Assistance et/ou aide fréquente à la marche

4 = Ne peut pas marcher même avec une aide

**8) Chutes (coter le dernier mois)**

- 0 = Aucune
- 1 = Chutes rares (moins d'une par mois)
- 2 = Chutes occasionnelles (moins d'une par semaine)
- 3 = Chute plus d'une fois par semaine
- 4 = Chute au moins une fois par jour (si le patient ne peut plus marcher du tout coter 4)

**9) Symptômes orthostatiques**

- 0 = Pas de symptômes\* orthostatiques
  - 1 = Symptômes orthostatiques rares et ne restreignent pas le patient dans les activités de la vie quotidienne
  - 2 = Symptômes orthostatiques fréquents survenant au moins une fois par semaine. Limitation modérée dans les activités de la vie quotidienne
  - 3 = Symptômes orthostatiques survenant la plupart du temps. Capable de rester debout plus d'une minute la plupart du temps. Limitation dans la plupart des activités de la vie quotidienne
  - 4 = Symptômes survenant constamment à l'orthostatisme. Incapable de rester debout < 1 minute la plupart du temps. Syncope/présyncope est fréquente si le patient tente de se lever
- \* syncope, faiblesse/fatigue, vision trouble ou douleur au cou, disparaissant si le patient s'allonge

**10) Troubles urinaires\***

- 0 = Normal
  - 1 = Urgence et/ou fréquence urinaire ne nécessitant pas de traitement
  - 2 = Urgence et/ou fréquence urinaire nécessitant un traitement
  - 3 = Urgence incontinence et/ou vidange incomplète de la vessie nécessitant des sondages intermittents
  - 4 = Incontinence nécessitant un sondage permanent
- \* les troubles urinaires ne doivent pas être en rapport avec une autre cause

**11) Troubles sexuels**

- 0 = Pas de problèmes
- 1 = Légèrement altérés comparés à l'état antérieur
- 2 = Modérément altérés comparés à l'état antérieur
- 3 = Sévèrement altérés comparés à l'état antérieur
- 4 = Pas d'activité sexuelle possible

**12) Transit intestinal**

- 0 = Pas de changement du transit intestinal habituel
- 1 = Constipation occasionnelle mais ne nécessitant pas de traitement
- 2 = Constipation fréquente nécessitant l'utilisation de laxatifs
- 3 = Constipation chronique nécessitant l'utilisation de laxatifs et de lavements
- 4 = Pas de transit intestinal spontané

UMSARS -I = |\_\_||\_\_| / 48

---

**UMSARS -II- ECHELLE D'EXAMEN MOTEUR**

Toujours coter le membre le plus affecté

**1) Expression faciale**

- 0 = Normale
- 1 = Hypomimie minime, peut être normale (visage impassible)
- 2 = Légère mais diminution nettement anormale de l'expression faciale
- 3 = Hypomimie modérée ; lèvres parfois entrouvertes
- 4 = Masque facial ou faciès figé avec perte sévère ou complète de l'expression faciale, lèvres entrouvertes à 0,6cm ou plus

**2) Parole**

*Le patient doit répéter plusieurs fois une phrase standard*

0 = Normale

1 = Légèrement ralentie, bredouillée et/ou dysphonique. N'a pas besoin de répéter les phrases

2 = Modérément ralentie, bredouillée et/ou dysphonique. Parfois on lui demande de répéter les phrases

3 = Sévèrement ralentie, bredouillée et/ou dysphonique. On lui demande fréquemment de répéter les phrases

4 = Incompréhensible

**3) Oculomotricité**

*(Les mouvements des yeux sont examinés en demandant au sujet de suivre lentement du regard les déplacements en horizontal du doigt de l'examineur, fixer latéralement le doigt dans différentes positions et accomplir les saccades entre deux doigts, chaque prise à une position excentrique approximativement de 30 degrés. L'examineur évalue les anomalies de la poursuite : (1) la poursuite lente entrecoupée, (2) nystagmus évoqué dans une position de l'œil en dessous de 45 degrés, (3) nystagmus évoqué dans une position de l'œil au dessus de 45 degrés, (4) saccade hypermétrique. Le signe (3) implique qu'il existe au moins deux signes oculomoteurs anormaux, le signe (2) étant présent)*

0 = Absent

1 = Un signe oculomoteur anormal

2 = Deux signes oculomoteurs anormaux

3 = Trois signes oculomoteurs anormaux

4 = Quatre signes oculomoteurs anormaux

**4) Tremblement de repos** (coter le membre le plus affecté)

0 = Absent

1 = Léger et rarement présent

2 = Faible amplitude et persistant. Ou d'amplitude modérée mais persistant seulement de façon intermittente

3 = Amplitude modérée et présent la plupart du temps

4 = Amplitude marquée et présent la plupart du temps



### 5) Tremblement d'action

*(Evaluer le tremblement postural bras tendus (A) et tremblement d'action au pointage du doigt (B). Coter le tremblement sévère et maximal dans les tâches du A et/ou B (la plus perturbée) et coter le membre le plus affecté)*

0 = Absent

1 = Léger tremblement de faible amplitude (A). Pas d'interférence avec le pointage du doigt (B)

2 = Amplitude modérée (A). Quelques interférences avec le pointage du doigt (B)

3 = Amplitude marquée (A). Interférences marquées avec le pointage du doigt (B)

4 = Amplitude sévère (A). Pointage du doigt impossible (B)

\* Essentiellement pointer les deux index l'un en face de l'autre

### 6) Rigidité (coter le membre le plus affecté)

*(Jugée lors des mouvements passifs des principales articulations avec un malade relaxé, en position assise. Ne pas tenir compte de la roue dentée)*

0 = Absente

1 = Légère ou détectable seulement quand on active les mouvements symétriques ou autres

2 = Légère à modérée

3 = Marquée mais la plupart des mouvements peuvent être effectués aisément

4 = Sévère, les mouvements sont effectués avec difficulté

### 7) Mouvements alternatifs rapides des mains

*(Mouvement de prono-supination des mains, verticalement ou horizontalement, avec la plus large amplitude possible, les deux mains séparément. Coter le membre le plus affecté. Noter que l'altération de la performance dans cette tâche peut être causée par une bradykinésie et/ou incoordination cérébelleuse. Coter la performance fonctionnelle sans tenir compte des troubles moteurs sous-jacents)*

0 = Normal

1 = Légèrement perturbés

2 = Modérément perturbés

3 = Sévèrement perturbés

4 = Peut à peine effectuer la tâche

**8) Tapotement des doigts**

*(Le patient tape le pouce avec l'index en succession rapide avec la meilleure amplitude possible. Chaque main pendant au moins 15 à 20 secondes. Coter le membre le plus affecté. Noter que l'altération de la performance dans cette tâche peut être causée par une bradykinésie et/ou incoordination cérébelleuse. Coter la performance fonctionnelle sans tenir compte des troubles moteurs sous-jacents.)*

0 = Normal.

1 = Légèrement perturbé

2 = Modérément perturbé

3 = Sévèrement perturbé

4 = Peut à peine effectuer le mouvement

**9) Agilité de la jambe**

*(Le patient est assis et tape le talon sur le sol en une succession rapide, en soulevant entièrement la jambe, l'amplitude doit être autour de 10 cm. Coter la jambe la plus affectée. Noter que l'altération de la performance dans cette tâche peut être causée par une bradykinésie et/ou incoordination cérébelleuse. Coter la performance fonctionnelle sans tenir compte des troubles moteurs sous-jacents)*

0 = Normale

1 = Légèrement perturbée

2 = Modérément perturbée

3 = Sévèrement perturbée

4 = Peut à peine effectuer le mouvement

**10) Test talon-genou**

*(Recommencer au moins trois fois la manœuvre de chaque côté. Coter le membre le plus affecté)*

0 = Normal

1 = Légèrement dysmétrique et ataxique

2 = Modérément dysmétrique et ataxique

3 = Sévèrement dysmétrique et ataxique

4 = Peut à peine effectuer le mouvement

**11) Se lever d'une chaise**

*(Le patient essaye de se lever d'une chaise à dos droit en bois ou en métal, les bras pliés devant la poitrine)*

0 = Normal

1 = Maladroit ou à besoin de plus d'un essai

2 = Se pousse sur les bras du siège

3 = Tend à tomber en arrière et doit essayer plus d'une fois mais peut se lever sans aide

4 = Incapable de se lever sans aide

**12) Posture**

0 = Normale

1 = Pas tout à fait droite, posture légèrement courbée, peut être normale pour une personne plus âgée

2 = Posture modérément courbée, nettement anormale ; peut être légèrement penchée d'un côté

3 = Posture sévèrement courbée avec cyphose: peut être modérément penchée d'un côté

4 = Courbure marquée avec posture très anormale

**13) Oscillations du corps**

*(Evaluer les oscillations spontanées du corps et la réponse à un déplacement postérieur soudain produit par une poussée sur les épaules alors que le patient est debout les yeux ouverts et les pieds légèrement écartés. Le patient doit être prévenu)*

0 = Normal

1 = Faibles oscillations du corps et/ou rétro pulsion avec un rétablissement de l'équilibre sans aide

2 = Oscillations modérées et/ou absence de réponse posturale ; peut tomber s'il n'est pas retenu par l'examineur

3 = Sévères oscillations du corps. Très instable. Tend à perdre l'équilibre spontanément

4 = Incapable de se tenir debout sans aide

<b>14) Marche</b>	<input type="checkbox"/>
-------------------	--------------------------

0 = Normale

1 = Légèrement perturbée

2 = Modérément perturbée, marche avec difficulté mais nécessite peu ou pas d'aide

3 = Sévèrement perturbée, nécessite une aide

4 = Ne peut pas marcher même avec une aide

UMSARS -II =  / 56

---

### UMSARS –III

#### Recherche d'hypotension orthostatique (cf. exploration SNA)

---

#### UMSARS -IV- ECHELLE D'INVALIDITE

1 = Complètement indépendant. Capable d'effectuer toutes les activités avec un minimum de difficulté ou de gêne. Tout à fait normal n'ayant conscience d'aucune difficulté.

2 = Pas complètement indépendant. Doit être aidé pour certaines activités.

3 = Plus dépendant. Doit être aidé dans la moitié de ses activités. Peut consacrer une grande partie de sa journée à des activités quotidiennes.

4 = Très dépendant. De temps en temps peut faire certaines activités seul ou les commencer seul. A besoin de beaucoup d'aide.

5= Totalement dépendant. Confiné au lit.

## Annexe II : Echelle de qualité de vie de Schrag (QoL-AMS)

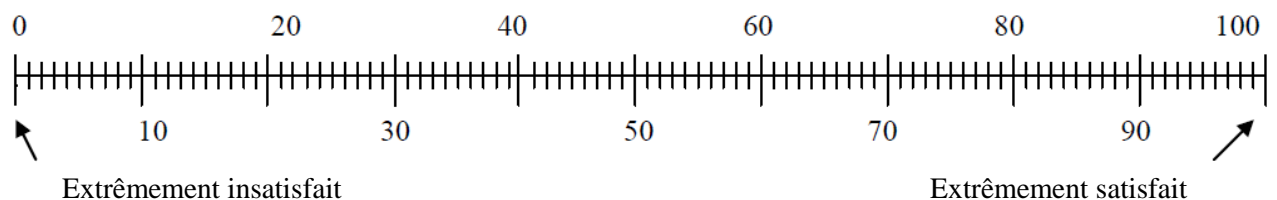
Meissner et al., 2013<sup>23</sup>

\* Ne s'applique pas

Ces 4 dernières semaines, avez-vous eu :	Pas de Problème 0	Problème léger 1	Problème moyen 2	Problème marqué 3	Problème extrême 4	*NA
1. des difficultés pour bouger ?						
2. des difficultés pour marcher ?						
3. des difficultés d'équilibre ?						
4. des difficultés à tenir debout sans aide ?						
5. des difficultés pour parler ?						
6. des difficultés pour avaler la nourriture ?						
7. trop de salive ou bavez-vous?						
8. des difficultés pour écrire à la main ?						
9. des difficultés pour vous nourrir ?						
10. des difficultés pour boire des liquides ?						
11. des difficultés pour vous habiller ?						
12. besoin d'aide pour aller aux toilettes?						
13. dû arrêter de faire les choses que vous aimiez faire (par exemple vos passe-temps favoris) ?						
14. des difficultés avec les activités domestiques (ex : ménage) ?						
15. des problèmes de vessie ?						
16. des problèmes de constipation ?						
17. des vertiges en vous levant ?						
18. une sensation de mains froides ou les pieds froids ?						
19. des douleurs dans le cou ou les épaules ?						
20. des douleurs ailleurs (ex : dos, jambes) ?						
21. des difficultés à être confortable la nuit ?						
22. des difficultés à respirer la nuit ?						

23. le sentiment d'être fatigué très rapidement (sans avoir fait d'effort) ?						
24. une perte d'énergie ?						
25. un ralentissement de la pensée ?						
26. des difficultés de concentration (ex : lecture ou télévision) ?						
27. le sentiment d'être frustré ?						
28. le sentiment d'être déprimé ?						
29. une perte de motivation ?						
30. le sentiment d'être impuissant? (face aux évènements)						
31. des préoccupations concernant l'avenir ?						
32. des préoccupations concernant votre famille ?						
33. le sentiment d'être abandonné ou isolé ?						
34. un manque de confiance en vous dans votre relation aux autres ?						
35. le sentiment que votre rôle dans votre famille ou au sein de vos amis a changé ?						
36. des difficultés à voir vos amis ?						
37. avez-vous dû abandonner vos activités sociales ? (ex : sorties pour repas ou spectacles)						
38. avez-vous eu des difficultés à parler de votre maladie à des amis ?						
39. le sentiment d'être gêné pour parler aux gens ?						
40. le sentiment que la vie est devenue ennuyeuse?						

Etre malade a un retentissement sur la qualité de vie. Veuillez indiquer comment vous évaluez votre qualité de vie en ce moment en mettant une croix entre 0 et 100 :



**Avez-vous d'autres commentaires ?**

.....

.....

.....

Ce questionnaire a été rempli :

- Par la personne atteinte d'atrophie multisystématisée (AMS)
- Quelqu'un d'autre en accord avec les réponses du patient
- Quelqu'un d'autre qui pense connaître suffisamment le patient pour répondre à sa place

<b>Somme questions 1-40</b>		<b>Résultat échelle analogique</b>	
-----------------------------	--	------------------------------------	--

## X- Bibliographie

1. Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* 1999; 354(9192): 1771-5.
2. Tison F, Yekhlef F, Chrysostome V, Sourgen C. Prevalence of multiple system atrophy. *Lancet* 2000; 355(9202): 495-6.
3. Wenning GK, Geser F, Krismer F, et al. The natural history of multiple system atrophy: a prospective European cohort study. *Lancet neurology* 2013; 12(3): 264-74.
4. Watanabe H, Saito Y, Terao S, et al. Progression and prognosis in multiple system atrophy: an analysis of 230 Japanese patients. *Brain : a journal of neurology* 2002; 125(Pt 5): 1070-83.
5. Ben-Shlomo Y, Wenning GK, Tison F, Quinn NP. Survival of patients with pathologically proven multiple system atrophy: a meta-analysis. *Neurology* 1997; 48(2): 384-93.
6. Wenning GK, Ben Shlomo Y, Magalhaes M, Daniel SE, Quinn NP. Clinical features and natural history of multiple system atrophy. An analysis of 100 cases. *Brain : a journal of neurology* 1994; 117 ( Pt 4): 835-45.
7. Schrag A, Wenning GK, Quinn N, Ben-Shlomo Y. Survival in multiple system atrophy. *Mov Disord* 2008; 23(2): 294-6.
8. Krim E, Yekhlef F, Chrysostome V, Ghorayeb I, Tison F. Multiple system atrophy: prognostic factors in the "MSA-Aquitaine" cohort. *Revue neurologique* 2007; 163(1): 54-65.
9. O'Sullivan SS, Massey LA, Williams DR, et al. Clinical outcomes of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy. *Brain : a journal of neurology* 2008; 131(Pt 5): 1362-72.
10. Jecmenica-Lukic M, Poewe W, Tolosa E, Wenning GK. Premotor signs and symptoms of multiple system atrophy. *Lancet neurology* 2012; 11(4): 361-8.
11. Sakakibara R, Hattori T, Uchiyama T, et al. Urinary dysfunction and orthostatic hypotension in multiple system atrophy: which is the more common and earlier manifestation? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2000; 68(1): 65-9.
12. Damon-Perriere N, Tison F, Meissner WG. Multiple system atrophy. *Psychologie & neuropsychiatrie du vieillissement* 2010; 8(3): 179-91.
13. Yabe I, Soma H, Takei A, Fujiki N, Yanagihara T, Sasaki H. MSA-C is the predominant clinical phenotype of MSA in Japan: analysis of 142 patients with probable MSA. *Journal of the neurological sciences* 2006; 249(2): 115-21.
14. Ghorayeb I, Bioulac B, Tison F. Sleep disorders in multiple system atrophy. *Journal of neural transmission* 2005; 112(12): 1669-75.



15. Plazzi G, Corsini R, Provini F, et al. REM sleep behavior disorders in multiple system atrophy. *Neurology* 1997; 48(4): 1094-7.
16. Iranzo A, Santamaria J, Rye DB, et al. Characteristics of idiopathic REM sleep behavior disorder and that associated with MSA and PD. *Neurology* 2005; 65(2): 247-52.
17. Tachibana N, Kimura K, Kitajima K, Shinde A, Kimura J, Shibasaki H. REM sleep motor dysfunction in multiple system atrophy: with special emphasis on sleep talk as its early clinical manifestation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1997; 63(5): 678-81.
18. Stankovic I, Krismer F, Jesic A, et al. Cognitive impairment in multiple system atrophy: a position statement by the Neuropsychology Task Force of the MDS Multiple System Atrophy (MODIMSA) study group. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2014; 29(7): 857-67.
19. Tison F, Wenning GK, Volonte MA, Poewe WR, Henry P, Quinn NP. Pain in multiple system atrophy. *Journal of neurology* 1996; 243(2): 153-6.
20. Visser M, Marinus J, Stiggelbout AM, Van Hilten JJ. Assessment of autonomic dysfunction in Parkinson's disease: the SCOPA-AUT. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2004; 19(11): 1306-12.
21. Sletten DM, Suarez GA, Low PA, Mandrekar J, Singer W. COMPASS 31: a refined and abbreviated Composite Autonomic Symptom Score. *Mayo Clinic proceedings* 2012; 87(12): 1196-201.
22. Schrag A, Geser F, Stampfer-Kountchev M, et al. Health-related quality of life in multiple system atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2006; 21(6): 809-15.
23. Meissner WG, Foubert-Samier A, Dupouy S, et al. Validation of the French version of the MSA health-related Quality of Life scale (MSA-QoL). *Revue neurologique* 2013; 169(1): 53-8.
24. Massey LA, Micallef C, Paviour DC, et al. Conventional magnetic resonance imaging in confirmed progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2012; 27(14): 1754-62.
25. Kraft E, Schwarz J, Trenkwalder C, Vogl T, Pfluger T, Oertel WH. The combination of hypointense and hyperintense signal changes on T2-weighted magnetic resonance imaging sequences: a specific marker of multiple system atrophy? *Archives of neurology* 1999; 56(2): 225-8.
26. Kraft E, Trenkwalder C, Auer DP. T2\*-weighted MRI differentiates multiple system atrophy from Parkinson's disease. *Neurology* 2002; 59(8): 1265-7.
27. Horimoto Y, Aiba I, Yasuda T, et al. Longitudinal MRI study of multiple system atrophy - when do the findings appear, and what is the course? *Journal of neurology* 2002; 249(7): 847-54.
28. Varrone A, Marek KL, Jennings D, Innis RB, Seibyl JP. [(123)I]beta-CIT SPECT imaging demonstrates reduced density of striatal dopamine transporters in Parkinson's disease and multiple

system atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2001; 16(6): 1023-32.

29. Eckert T, Barnes A, Dhawan V, et al. FDG PET in the differential diagnosis of parkinsonian disorders. *NeuroImage* 2005; 26(3): 912-21.

30. Tison F. Les syndromes parkinsoniens atypiques et secondaires: Elsevier-Masson; 2006.

31. Gilman S, Wenning GK, Low PA, et al. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 2008; 71(9): 670-6.

32. Wenning GK, Colosimo C. Diagnostic criteria for multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *Revue neurologique* 2010; 166(10): 829-33.

33. Quinn N. Multiple system atrophy the nature of the beast. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1989; Special supplement 78-9.

34. Flabeau O, Meissner WG, Tison F. Multiple system atrophy: current and future approaches to management. *Therapeutic advances in neurological disorders* 2010; 3(4): 249-63.

35. Constantinescu R, Richard I, Kurlan R. Levodopa responsiveness in disorders with parkinsonism: a review of the literature. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2007; 22(15): 2141-8; quiz 295.

36. Wenning GK, Tison F, Ben Shlomo Y, Daniel SE, Quinn NP. Multiple system atrophy: a review of 203 pathologically proven cases. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 1997; 12(2): 133-47.

37. Jain S, Dawson J, Quinn NP, Playford ED. Occupational therapy in multiple system atrophy: a pilot randomized controlled trial. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2004; 19(11): 1360-4.

38. Freeman R. Clinical practice. Neurogenic orthostatic hypotension. *The New England journal of medicine* 2008; 358(6): 615-24.

39. Deguchi K, Ikeda K, Sasaki I, et al. Effects of daily water drinking on orthostatic and postprandial hypotension in patients with multiple system atrophy. *Journal of neurology* 2007; 254(6): 735-40.

40. Young TM, Mathias CJ. The effects of water ingestion on orthostatic hypotension in two groups of chronic autonomic failure: multiple system atrophy and pure autonomic failure. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2004; 75(12): 1737-41.

41. Wright RA, Kaufmann HC, Perera R, et al. A double-blind, dose-response study of midodrine in neurogenic orthostatic hypotension. *Neurology* 1998; 51(1): 120-4.

42. Low PA, Gilden JL, Freeman R, Sheng KN, McElligott MA. Efficacy of midodrine vs placebo in neurogenic orthostatic hypotension. A randomized, double-blind multicenter study. Midodrine Study Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1997; 277(13): 1046-51.

43. Jankovic J, Gilden JL, Hiner BC, et al. Neurogenic orthostatic hypotension: a double-blind, placebo-controlled study with midodrine. *The American journal of medicine* 1993; 95(1): 38-48.
44. Ahmed Z, Asi YT, Sailer A, et al. The neuropathology, pathophysiology and genetics of multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012; 38(1): 4-24.
45. Papp MI, Kahn JE, Lantos PL. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *Journal of the neurological sciences* 1989; 94(1-3): 79-100.
46. Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuroscience letters* 1998; 249(2-3): 180-2.
47. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388(6645): 839-40.
48. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(11): 6469-73.
49. Ozawa T, Paviour D, Quinn NP, et al. The spectrum of pathological involvement of the striatonigral and olivopontocerebellar systems in multiple system atrophy: clinicopathological correlations. *Brain : a journal of neurology* 2004; 127(Pt 12): 2657-71.
50. Ozawa T. Morphological substrate of autonomic failure and neurohormonal dysfunction in multiple system atrophy: impact on determining phenotype spectrum. *Acta neuropathologica* 2007; 114(3): 201-11.
51. Song YJ, Lundvig DM, Huang Y, et al. p25alpha relocalizes in oligodendroglia from myelin to cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *The American journal of pathology* 2007; 171(4): 1291-303.
52. Matsuo A, Akiguchi I, Lee GC, McGeer EG, McGeer PL, Kimura J. Myelin degeneration in multiple system atrophy detected by unique antibodies. *The American journal of pathology* 1998; 153(3): 735-44.
53. Duda JE, Giasson BI, Gur TL, et al. Immunohistochemical and biochemical studies demonstrate a distinct profile of alpha-synuclein permutations in multiple system atrophy. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2000; 59(9): 830-41.
54. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neuroscience letters* 1998; 251(3): 205-8.
55. Jellinger KA, Lantos PL. Papp-Lantos inclusions and the pathogenesis of multiple system atrophy: an update. *Acta neuropathologica* 2010; 119(6): 657-67.

56. Papp MI, Lantos PL. The distribution of oligodendroglial inclusions in multiple system atrophy and its relevance to clinical symptomatology. *Brain : a journal of neurology* 1994; 117 ( Pt 2): 235-43.
57. Inoue M, Yagishita S, Ryo M, Hasegawa K, Amano N, Matsushita M. The distribution and dynamic density of oligodendroglial cytoplasmic inclusions (GCIs) in multiple system atrophy: a correlation between the density of GCIs and the degree of involvement of striatonigral and olivopontocerebellar systems. *Acta neuropathologica* 1997; 93(6): 585-91.
58. Papp MI, Lantos PL. Accumulation of tubular structures in oligodendroglial and neuronal cells as the basic alteration in multiple system atrophy. *Journal of the neurological sciences* 1992; 107(2): 172-82.
59. Kato S, Nakamura H. Cytoplasmic argyrophilic inclusions in neurons of pontine nuclei in patients with olivopontocerebellar atrophy: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Acta neuropathologica* 1990; 79(6): 584-94.
60. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14(1): 38-48.
61. Murray IVJ. Synucleinopathies a pathological and molecular review Clinical neurosciences research 2001. *Clinical Neuroscience Research* 2001; 1: 445-55.
62. Lee FJ, Liu F, Pristupa ZB, Niznik HB. Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2001; 15(6): 916-26.
63. Marques O. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death. *Cell Death and Disease* 2012; 3(e350).
64. Scholz SW, Houlden H, Schulte C, et al. SNCA variants are associated with increased risk for multiple system atrophy. *Annals of neurology* 2009; 65(5): 610-4.
65. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders. *Lancet neurology* 2011; 10(11): 1015-25.
66. Miller DW, Johnson JM, Solano SM, Hollingsworth ZR, Standaert DG, Young AB. Absence of alpha-synuclein mRNA expression in normal and multiple system atrophy oligodendroglia. *Journal of neural transmission* 2005; 112(12): 1613-24.
67. Reyes JF, Rey NL, Bousset L, Melki R, Brundin P, Angot E. Alpha-synuclein transfers from neurons to oligodendrocytes. *Glia* 2014; 62(3): 387-98.
68. Asi YT, Simpson JE, Heath PR, et al. Alpha-synuclein mRNA expression in oligodendrocytes in MSA. *Glia* 2014; 62(6): 964-70.
69. Souza JM, Giasson BI, Chen Q, Lee VM, Ischiropoulos H. 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* 2000; 275(24): 18344-9.

70. Uversky VN, Li J, Fink AL. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276(14): 10737-44.

71. Serpell LC, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther RA. Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97(9): 4897-902.

72. Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276(4): 2380-6.

73. Marques O, Outeiro TF. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death. *Cell death & disease* 2012; 3: e350.

74. Winner B, Jappelli R, Maji SK, et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108(10): 4194-9.

75. Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of neural transmission* 2003; 110(5): 517-36.

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

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

78. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 33(6): 599-614.

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

80. Lee HJ, Patel S, Lee SJ. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2005; 25(25): 6016-24.

81. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, et al. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003; 17(13): 1945-7.

82. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, et al. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006; 20(3): 419-25.

83. Gai WP, Power JH, Blumbergs PC, Culvenor JG, Jensen PH. Alpha-synuclein immunoisolation of glial inclusions from multiple system atrophy brain tissue reveals multiprotein components. *Journal of neurochemistry* 1999; 73(5): 2093-100.
84. Kovacs GG, Laszlo L, Kovacs J, et al. Natively unfolded tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 is a common marker of alpha-synucleinopathies. *Neurobiology of disease* 2004; 17(2): 155-62.
85. Ovadi J, Orosz F. An unstructured protein with destructive potential: TPPP/p25 in neurodegeneration. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2009; 31(6): 676-86.
86. Lehotzky A, Lau P, Tokesi N, Muja N, Hudson LD, Ovadi J. Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25) is critical for oligodendrocyte differentiation. *Glia* 2010; 58(2): 157-68.
87. Hasegawa T, Baba T, Kobayashi M, et al. Role of TPPP/p25 on alpha-synuclein-mediated oligodendroglial degeneration and the protective effect of SIRT2 inhibition in a cellular model of multiple system atrophy. *Neurochemistry international* 2010; 57(8): 857-66.
88. Kragh CL, Lund LB, Febbraro F, et al. Alpha-synuclein aggregation and Ser-129 phosphorylation-dependent cell death in oligodendroglial cells. *The Journal of biological chemistry* 2009; 284(15): 10211-22.
89. Stefanova N, Reindl M, Neumann M, Kahle PJ, Poewe W, Wenning GK. Microglial activation mediates neurodegeneration related to oligodendroglial alpha-synucleinopathy: implications for multiple system atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2007; 22(15): 2196-203.
90. Stefanova N, Tison F, Reindl M, Poewe W, Wenning GK. Animal models of multiple system atrophy. *Trends in neurosciences* 2005; 28(9): 501-6.
91. Klegeris A, Pelech S, Giasson BI, et al. Alpha-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiology of aging* 2008; 29(5): 739-52.
92. Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 2005; 11 Suppl 1: S9-S15.
93. Shults CW, Rockenstein E, Crews L, et al. Neurological and neurodegenerative alterations in a transgenic mouse model expressing human alpha-synuclein under oligodendrocyte promoter: implications for multiple system atrophy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2005; 25(46): 10689-99.
94. Duda JE, Giasson BI, Chen Q, et al. Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies. *The American journal of pathology* 2000; 157(5): 1439-45.
95. Fernagut PO, Dehay B, Maillard A, et al. Multiple system atrophy: a prototypical synucleinopathy for disease-modifying therapeutic strategies. *Neurobiology of disease* 2014; 67: 133-9.

96. Bensimon G, Ludolph A, Agid Y, et al. Riluzole treatment, survival and diagnostic criteria in Parkinson plus disorders: the NNIPPS study. *Brain : a journal of neurology* 2009; 132(Pt 1): 156-71.
97. Trojanowski JQ, Growdon JH. A new consensus report on biomarkers for the early antemortem diagnosis of Alzheimer disease: current status, relevance to drug discovery, and recommendations for future research. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 1998; 57(6): 643-4.
98. Jakowec MW, Petzinger GM, Sastry S, Donaldson DM, McCormack A, Langston JW. The native form of alpha-synuclein is not found in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease or normal controls. *Neuroscience letters* 1998; 253(1): 13-6.
99. Mollenhauer B, Locascio JJ, Schulz-Schaeffer W, Sixel-Doring F, Trenkwalder C, Schlossmacher MG. alpha-Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet neurology* 2011; 10(3): 230-40.
100. Hall S, Ohrfelt A, Constantinescu R, et al. Accuracy of a panel of 5 cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of patients with dementia and/or parkinsonian disorders. *Archives of neurology* 2012; 69(11): 1445-52.
101. Tateno F, Sakakibara R, Kawai T, Kishi M, Murano T. Alpha-synuclein in the cerebrospinal fluid differentiates synucleinopathies (Parkinson Disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy) from Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders* 2012; 26(3): 213-6.
102. Wang Y, Shi M, Chung KA, et al. Phosphorylated alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Science translational medicine* 2012; 4(121): 121ra20.
103. Shi M, Bradner J, Hancock AM, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Annals of neurology* 2011; 69(3): 570-80.
104. Mondello S, Constantinescu R, Zetterberg H, Andreasson U, Holmberg B, Jeromin A. CSF alpha-synuclein and UCH-L1 levels in Parkinson's disease and atypical parkinsonian disorders. *Parkinsonism & related disorders* 2014.
105. Aerts MB, Esselink RA, Abdo WF, Bloem BR, Verbeek MM. CSF alpha-synuclein does not differentiate between parkinsonian disorders. *Neurobiology of aging* 2012; 33(2): 430 e1-3.
106. Herbert MK, Eeftens JM, Aerts MB, et al. CSF levels of DJ-1 and tau distinguish MSA patients from PD patients and controls. *Parkinsonism & related disorders* 2014; 20(1): 112-5.
107. Slaets S, Vanmechelen E, Le Bastard N, et al. Increased CSF alpha-synuclein levels in Alzheimer's disease: Correlation with tau levels. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 2014: Epub ahead of print.
108. Foulds PG, Yokota O, Thurston A, et al. Post mortem cerebrospinal fluid alpha-synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other alpha-synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 2012; 45(1): 188-95.

109. Mollenhauer B, Trautmann E, Otte B, et al. alpha-Synuclein in human cerebrospinal fluid is principally derived from neurons of the central nervous system. *Journal of neural transmission* 2012; 119(7): 739-46.
110. Barbour R, Kling K, Anderson JP, et al. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neuro-degenerative diseases* 2008; 5(2): 55-9.
111. Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Journal of neural transmission* 2006; 113(10): 1435-9.
112. Sun ZF, Xiang XS, Chen Z, et al. Increase of the plasma alpha-synuclein levels in patients with multiple system atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2014; 29(3): 375-9.
113. van Geel WJ, Abdo WF, Melis R, Williams S, Bloem BR, Verbeek MM. A more efficient enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of alpha-synuclein in cerebrospinal fluid. *Journal of neuroscience methods* 2008; 168(1): 182-5.
114. Tinsley RB, Kotschet K, Modesto D, et al. Sensitive and specific detection of alpha-synuclein in human plasma. *Journal of neuroscience research* 2010; 88(12): 2693-700.
115. Mollenhauer B, Cullen V, Kahn I, et al. Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Experimental neurology* 2008; 213(2): 315-25.
116. Mollenhauer B. Quantification of alpha-synuclein in cerebrospinal fluid: how ideal is this biomarker for Parkinson's disease? *Parkinsonism & related disorders* 2014; 20 Suppl 1: S76-9.
117. Brannstrom K, Lindhagen-Persson M, Gharibyan AL, et al. A generic method for design of oligomer-specific antibodies. *PLoS one* 2014; 9(3): e90857.
118. Bidinosti M, Shimshek DR, Mollenhauer B, et al. Novel one-step immunoassays to quantify alpha-synuclein: applications for biomarker development and high-throughput screening. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287(40): 33691-705.
119. Compta Y, Parkkinen L, O'Sullivan SS, et al. Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: which is more important? *Brain : a journal of neurology* 2011; 134(Pt 5): 1493-505.
120. Kalaitzakis ME, Walls AJ, Pearce RK, Gentleman SM. Striatal Aβ peptide deposition mirrors dementia and differentiates DLB and PDD from other parkinsonian syndromes. *Neurobiology of disease* 2011; 41(2): 377-84.
121. Olah J, Vincze O, Virok D, et al. Interactions of pathological hallmark proteins: tubulin polymerization promoting protein/p25, beta-amyloid, and alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286(39): 34088-100.



122. Holmberg B, Johnels B, Blennow K, Rosengren L. Cerebrospinal fluid Abeta42 is reduced in multiple system atrophy but normal in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2003; 18(2): 186-90.
123. Mollenhauer B, Bibl M, Esselmann H, et al. Tauopathies and synucleinopathies: do cerebrospinal fluid beta-amyloid peptides reflect disease-specific pathogenesis? *Journal of neural transmission* 2007; 114(7): 919-27.
124. Sussmuth SD, Uttner I, Landwehrmeyer B, et al. Differential pattern of brain-specific CSF proteins tau and amyloid-beta in Parkinsonian syndromes. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2010; 25(9): 1284-8.
125. Bech S, Hjermand LE, Salvesen L, et al. Amyloid-related biomarkers and axonal damage proteins in parkinsonian syndromes. *Parkinsonism & related disorders* 2012; 18(1): 69-72.
126. Verbeek MM, Abdo WF, De Jong D, Horstink MW, Kremer BP, Bloem BR. Cerebrospinal fluid Abeta42 levels in multiple system atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2004; 19(2): 238-40; author reply 40-1.
127. Jesse S, Brettschneider J, Sussmuth SD, et al. Summary of cerebrospinal fluid routine parameters in neurodegenerative diseases. *Journal of neurology* 2011; 258(6): 1034-41.
128. Constantinescu R, Andreasson U, Li S, et al. Proteomic profiling of cerebrospinal fluid in parkinsonian disorders. *Parkinsonism & related disorders* 2010; 16(8): 545-9.
129. Salvesen L, Bech S, Lokkegaard A, et al. The DJ-1 concentration in cerebrospinal fluid does not differentiate among Parkinsonian syndromes. *Parkinsonism & related disorders* 2012; 18(7): 899-901.
130. Drexler HG, Quentmeier H. FLT3: receptor and ligand. *Growth factors* 2004; 22(2): 71-3.
131. Chua SJ, Bielecki R, Wong CJ, Yamanaka N, Rogers IM, Casper RF. Neural progenitors, neurons and oligodendrocytes from human umbilical cord blood cells in a serum-free, feeder-free cell culture. *Biochemical and biophysical research communications* 2009; 379(2): 217-21.
132. Brazel CY, Ducceschi MH, Pytowski B, Levison SW. The FLT3 tyrosine kinase receptor inhibits neural stem/progenitor cell proliferation and collaborates with NGF to promote neuronal survival. *Molecular and cellular neurosciences* 2001; 18(4): 381-93.
133. Silajdzic E, Constantinescu R, Holmberg B, Bjorkqvist M, Hansson O. Flt3 ligand does not differentiate between Parkinsonian disorders. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2014: Epub ahead of print.
134. Olsson B, Constantinescu R, Holmberg B, Andreasen N, Blennow K, Zetterberg H. The glial marker YKL-40 is decreased in synucleinopathies. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2013; 28(13): 1882-5.

135. Abdo WF, De Jong D, Hendriks JC, et al. Cerebrospinal fluid analysis differentiates multiple system atrophy from Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2004; 19(5): 571-9.
136. Holmberg B, Rosengren L, Karlsson JE, Johnels B. Increased cerebrospinal fluid levels of neurofilament protein in progressive supranuclear palsy and multiple-system atrophy compared with Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 1998; 13(1): 70-7.
137. Constantinescu R, Rosengren L, Johnels B, Zetterberg H, Holmberg B. Consecutive analyses of cerebrospinal fluid axonal and glial markers in Parkinson's disease and atypical Parkinsonian disorders. *Parkinsonism & related disorders* 2010; 16(2): 142-5.
138. Wang Y, Hancock AM, Bradner J, et al. Complement 3 and factor h in human cerebrospinal fluid in Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple-system atrophy. *The American journal of pathology* 2011; 178(4): 1509-16.
139. Kaufman E, Hall S, Surova Y, Widner H, Hansson O, Lindqvist D. Proinflammatory cytokines are elevated in serum of patients with multiple system atrophy. *PloS one* 2013; 8(4): e62354.
140. Konings CH, Kuiper MA, Teerlink T, Mulder C, Scheltens P, Wolters EC. Normal cerebrospinal fluid glutathione concentrations in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and multiple system atrophy. *Journal of the neurological sciences* 1999; 168(2): 112-5.
141. Kikuchi A, Takeda A, Onodera H, et al. Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiology of disease* 2002; 9(2): 244-8.
142. Ishigami N, Tokuda T, Ikegawa M, et al. Cerebrospinal fluid proteomic patterns discriminate Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2012; 27(7): 851-7.
143. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secretogranin family. *The New England journal of medicine* 2003; 348(12): 1134-49.
144. Helle KB. Regulatory peptides from chromogranin A and secretogranin II: putative modulators of cells and tissues involved in inflammatory conditions. *Regul Pept* 2010; 165(1): 45-51.
145. Helle KB. The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 2004; 79(4): 769-94.
146. Chen M, Tempst P, Yankner BA. Secretogranin I/chromogranin B is a heparin-binding adhesive protein. *Journal of neurochemistry* 1992; 58(5): 1691-8.
147. Paik MJ, Ahn YH, Lee PH, et al. Polyamine patterns in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2010; 411(19-20): 1532-5.

148. Lee PH, Lee G, Paik MJ. Polyunsaturated fatty acid levels in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2008; 23(2): 309-10.
149. Valletunga A, Ragusa M, Di Mauro S, et al. Identification of circulating microRNAs for the differential diagnosis of Parkinson's disease and Multiple System Atrophy. *Frontiers in cellular neuroscience* 2014; 8: 156.
150. Abdo WF, Bloem BR, Van Geel WJ, Esselink RA, Verbeek MM. CSF neurofilament light chain and tau differentiate multiple system atrophy from Parkinson's disease. *Neurobiology of aging* 2007; 28(5): 742-7.
151. Abdo WF, van de Warrenburg BP, Kremer HP, Bloem BR, Verbeek MM. CSF biomarker profiles do not differentiate between the cerebellar and parkinsonian phenotypes of multiple system atrophy. *Parkinsonism & related disorders* 2007; 13(8): 480-2.
152. Holmberg B, Johnels B, Ingvarsson P, Eriksson B, Rosengren L. CSF-neurofilament and levodopa tests combined with discriminant analysis may contribute to the differential diagnosis of Parkinsonian syndromes. *Parkinsonism & related disorders* 2001; 8(1): 23-31.
153. Petzold A, Thompson EJ, Keir G, et al. Longitudinal one-year study of levels and stoichiometry of neurofilament heavy and light chain concentrations in CSF in patients with multiple system atrophy. *Journal of the neurological sciences* 2009; 279(1-2): 76-9.
154. Brettschneider J, Petzold A, Sussmuth SD, et al. Neurofilament heavy-chain NfH(SMI35) in cerebrospinal fluid supports the differential diagnosis of Parkinsonian syndromes. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2006; 21(12): 2224-7.
155. Martinez-Rodriguez JE, Seppi K, Cardozo A, et al. Cerebrospinal fluid hypocretin-1 levels in multiple system atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2007; 22(12): 1822-4.
156. Abdo WF, Bloem BR, Kremer HP, Lammers GJ, Verbeek MM, Overeem S. CSF hypocretin-1 levels are normal in multiple-system atrophy. *Parkinsonism & related disorders* 2008; 14(4): 342-4.
157. Polinsky RJ, Brown RT, Burns RS, Harvey-White J, Kopin IJ. Low lumbar CSF levels of homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in multiple system atrophy with autonomic failure. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1988; 51(7): 914-9.
158. Goldstein DS, Holmes C, Benth O, et al. Biomarkers to detect central dopamine deficiency and distinguish Parkinson disease from multiple system atrophy. *Parkinsonism & related disorders* 2008; 14(8): 600-7.
159. Goldstein DS, Holmes C, Sharabi Y. Cerebrospinal fluid biomarkers of central catecholamine deficiency in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Brain : a journal of neurology* 2012; 135(Pt 6): 1900-13.
160. Goldstein DS, Holmes C, Patronas N, Kopin IJ. Cerebrospinal fluid levels of catechols in patients with neurogenic orthostatic hypotension. *Clinical science* 2003; 104(6): 649-54.

161. Goldstein DS, Holmes C, Sharabi Y, Brentzel S, Eisenhofer G. Plasma levels of catechols and metanephrines in neurogenic orthostatic hypotension. *Neurology* 2003; 60(8): 1327-32.
162. Ichikawa N. Study on monoamine metabolite contents of cerebrospinal fluid in patients with neurodegenerative diseases. *The Tohoku journal of experimental medicine* 1986; 150(4): 435-46.
163. Nishi K, Kondo T, Narabayashi H, Takubo H, Muramoto S, Araki H. Unresponsiveness to L-DOPA in parkinsonian patients: a study of homovanillic acid concentration in the cerebrospinal fluid. *Journal of the neurological sciences* 1989; 92(1): 65-70.
164. Goldstein DS, Polinsky RJ, Garty M, et al. Patterns of plasma levels of catechols in neurogenic orthostatic hypotension. *Annals of neurology* 1989; 26(4): 558-63.
165. Lindvall B, Olsson JE. Monoamine metabolites and neuropeptides in patients with Parkinson's disease, Huntington's chorea, Shy-Drager syndrome, and torsion dystonia. *Advances in neurology* 1990; 53: 117-22.
166. Martignoni E, Blandini F, Petraglia F, Pacchetti C, Bono G, Nappi G. Cerebrospinal fluid norepinephrine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and neuropeptide Y levels in Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia of the Alzheimer type. *Journal of neural transmission Parkinson's disease and dementia section* 1992; 4(3): 191-205.
167. Kuiper MA, Konings CH, Bergmans PL, Wolters EC. Whole blood monoamine oxidase activity in Parkinson's disease and multiple system atrophy patients. *Journal of the neurological sciences* 1993; 117(1-2): 41-5.
168. Kuroda H. Gamma-aminobutyric acid (GABA) in cerebrospinal fluid. *Acta medica Okayama* 1983; 37(3): 167-77.
169. Tosca P, Canevari L, Di Paolo E, et al. Glutamate and GABA levels in CSF from patients affected by dementia and olivo-ponto-cerebellar atrophy. *Acta neurologica Scandinavica* 1992; 85(6): 430-5.
170. Polinsky RJ, Holmes KV, Brown RT, Weise V. CSF acetylcholinesterase levels are reduced in multiple system atrophy with autonomic failure. *Neurology* 1989; 39(1): 40-4.
171. Konagaya M, Konagaya Y, Iida M. CSF acetylcholinesterase activity in central neurological diseases involving cholinergic systems. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology* 1992; 32(3): 266-71.
172. Williams AC, Levine RA, Chase TN, Lovenberg W, Calne DB. CFS hydroxylase cofactor levels in some neurological diseases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1980; 43(8): 735-8.
173. Duvoisin RC, Nicklas WJ, Ritchie V, Sage J, Chokroverty S. Low leukocyte glutamate dehydrogenase activity does not correlate with a particular type of multiple system atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1988; 51(12): 1508-11.

174. Sorbi S, Tonini S, Giannini E, Piacentini S, Marini P, Amaducci L. Abnormal platelet glutamate dehydrogenase activity and activation in dominant and nondominant olivopontocerebellar atrophy. *Annals of neurology* 1986; 19(3): 239-45.
175. Konagaya Y, Konagaya M, Takayanagi T. Glutamate dehydrogenase and its isozyme activity in olivopontocerebellar atrophy. *Journal of the neurological sciences* 1986; 74(2-3): 231-6.
176. Finocchiaro G, Taroni F, Di Donato S. Glutamate dehydrogenase in olivopontocerebellar atrophies: leukocytes, fibroblasts, and muscle mitochondria. *Neurology* 1986; 36(4): 550-3.
177. Aubby D, Saggu HK, Jenner P, Quinn NP, Harding AE, Marsden CD. Leukocyte glutamate dehydrogenase activity in patients with degenerative neurological disorders. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1988; 51(7): 893-902.
178. Kuiper MA, Mulder C, van Kamp GJ, Scheltens P, Wolters EC. Cerebrospinal fluid ferritin levels of patients with Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple system atrophy. *Journal of neural transmission Parkinson's disease and dementia section* 1994; 7(2): 109-14.
179. Kuiper MA, Teerlink T, Visser JJ, Bergmans PL, Scheltens P, Wolters EC. L-glutamate, L-arginine and L-citrulline levels in cerebrospinal fluid of Parkinson's disease, multiple system atrophy, and Alzheimer's disease patients. *Journal of neural transmission* 2000; 107(2): 183-9.
180. Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, et al. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 2010; 75(20): 1766-72.
181. Hong Z, Shi M, Chung KA, et al. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 2010; 133(Pt 3): 713-26.
182. Kang JH, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, et al. Association of cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and alpha-synuclein levels with clinical features of drug-naïve patients with early Parkinson disease. *JAMA neurology* 2013; 70(10): 1277-87.
183. Meissner WG, Foubert-Samier A, Dupouy S, et al. Assessment of quality of life with the multiple system atrophy health-related quality of life scale. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2012; 27(12): 1574-7.
184. Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain : a journal of neurology* 2002; 125(Pt 4): 861-70.
185. Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Archives of neurology* 2007; 64(3): 343-9.
186. Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, et al. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Annals of neurology* 2009; 65(4): 403-13.

187. Wenning GK, Tison F, Seppi K, et al. Development and validation of the Unified Multiple System Atrophy Rating Scale (UMSARS). *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2004; 19(12): 1391-402.