

## **ATH434 réduit la neurodégénérescence liée à l'alpha-synucléine dans un modèle murin d'AMS**

### **RESUME**

#### **Contexte**

L'atrophie multi-systématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative mortelle caractérisée par une  $\alpha$ -synucléine agrégée ( $\alpha$ -syn) dans les oligodendrocytes et accompagnée d'une dégénérescence striatonigrale et olivopontocérébelleuse et de symptômes moteurs. Les principales caractéristiques de l'AMS sont répliquées chez la souris transgénique PLP- $\alpha$ -syn, notamment la dégénérescence striatonigrale progressive et la détérioration motrice. Il n'existe actuellement aucun traitement approuvé pour l'AMS. L'ATH434 est un nouvel inhibiteur de petites molécules pénétrant dans le cerveau, biodisponible par voie orale, de l'agrégation  $\alpha$ -syn.

#### **Objectifs**

Caractériser l'ATH434 pour la modification de la maladie dans un modèle murin d'AMS.

#### **Méthodes**

Des souris PLP- $\alpha$ -syn (souris AMS) âgées de six mois ont été traitées par ATH434 (ATH434 dans la nourriture) ou non traitées (nourriture normale) pendant 6 mois. Le comportement moteur et le nombre de neurones nigraux et striataux ont été évalués. Les agrégats et oligomères de  $\alpha$ -syn ont été quantifiés par des analyses immunohistochimiques et western blot. L'activation microgliale et la neuroinflammation ont été évaluées par des analyses histologiques et moléculaires. Le fer ferrique dans la Substantia nigra a été évalué avec la méthode Perls.

#### **Résultats**

Les souris AMS traitées à l'ATH434 ont démontré une préservation des performances motrices associée à la neuroprotection des neurones nigraux et striataux. Le sauvetage du phénotype était en corrélation avec la réduction des inclusions et des oligomères  $\alpha$ -syn chez les animaux recevant l'ATH434. Les souris traitées à l'ATH434 présentaient une activité lysosomale significativement accrue de la microglie sans augmentation des marqueurs pro-inflammatoires, suggérant un rôle dans la clairance  $\alpha$ -syn. Le traitement par ATH434 était associé à des taux de fer nigraux intracellulaires plus faibles.

## Conclusion

Nos résultats démontrent l'effet bénéfique modificateur de la maladie de l'ATH434 dans l' $\alpha$ -synucléinopathie oligodendrogliale sur le phénotype moteur et la pathologie neurodégénérative chez la souris transgénique PLP- $\alpha$ -syn et soutiennent le développement de l'ATH434 pour l'AMS. © 2021 Les auteurs. *Troubles du mouvement* publié par Wiley Periodicals LLC au nom de l'International Parkinson and Movement Disorder Society

\*\*\*\*\*

L'atrophie multi-systématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative rare caractérisée cliniquement par une défaillance autonome et une déficience motrice progressive. Les caractéristiques pathologiques de l'AMS comprennent l'accumulation anormale d' $\alpha$ -synucléine ( $\alpha$ -syn) principalement dans le cytoplasme des oligodendrocytes, formant ce qu'on appelle des inclusions cytoplasmiques gliales (GCI), accompagnées d'une dégénérescence striatonigrale (SND) dans la variante parkinsonienne de la maladie (AMS-P) et d'une atrophie olivo-pontocérébelleuse (OPCA) dans la variante cérébelleuse (AMS-C). La MSA est une maladie mortelle, entraînant la mort quelques années après l'apparition des symptômes, sans traitement disponible.

Comme pour la maladie de Parkinson (MP), l'agrégation et l'accumulation anormales d' $\alpha$ -syn dans le AMS sont associées à un dysfonctionnement glial et neuronal, à une neuroinflammation et à une neurodégénérescence, cependant, l'origine des inclusions d' $\alpha$ -syn dans l'AMS est encore inconnue. De nombreuses publications ont récemment montré la capacité de l' $\alpha$ -syn à être transférée de cellule à cellule et à se propager à la manière d'un prion et, par conséquent, l'inhibition de l'agrégation de l' $\alpha$ -syn constitue une stratégie thérapeutique prometteuse dans les -synucléinopathies. L'utilisation de petites molécules pour cibler l'agrégation de l' $\alpha$ -syn a montré des résultats prometteurs dans des modèles précliniques de PD et d'AMS, soutenant leur utilisation dans les essais cliniques actuels.

ATH434, anciennement PBT434, est une nouvelle petite molécule biodisponible par voie orale et pénétrant le cerveau qui est capable d'inhiber l'agrégation d' $\alpha$ -syn. L'ATH434 a une affinité de liaison au fer compétitive pour l' $\alpha$ -syn mais pas pour les protéines endogènes de distribution du fer. Dans une précédente étude, l'usage de ce composé a empêché la perte de neurones dans la substance noire, diminué l'accumulation d' $\alpha$ -synucléin nigrale et les niveaux de fer nigraux et préservé les performances motrices dans des modèles animaux de MP. Par conséquent, l'ATH434 pourrait constituer un composé prometteur pour atténuer la progression de la maladie dans l'AMS.

Le modèle murin transgénique PLP- $\alpha$ -syn de l'AMS récapitule bon nombre des caractéristiques cliniques et pathologiques observées chez les patients en surexprimant l' $\alpha$ -syn humaine sous le promoteur du gène oligodendrocytes PLP (protéine protéolipide). Ces souris développent des agrégats de type GCI, une défaillance autonome, SND progressif et déficience motrice, récapitulant l'histoire naturelle de la maladie humaine. Ainsi, ce modèle animal constitue un outil préclinique précieux pour évaluer l'effet des thérapies de modification de la maladie pour l'AMS. Dans la présente étude préclinique, nous avons évalué l'efficacité de l'ATH434 sur des souris PLP- $\alpha$ -syn pour modifier les performances dans les tâches

motrices, pour modifier la progression de la SND, la densité des agrégats de type GCI et le niveau d'oligomères  $\alpha$ -syn.

## 1 Matériel et méthodes

### 1.1 Animaux et traitements

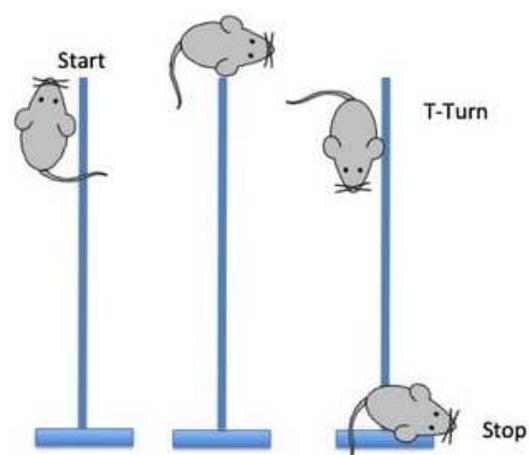
Les souris PLP- $\alpha$ -syn ont été maintenues dans des conditions sans agent pathogène à température contrôlée avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures. Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux directives éthiques avec l'autorisation du ministère fédéral autrichien des sciences et de la recherche (BMBWF-66.011/0080-V/3b/2019). Des souris PLP- $\alpha$ -syn âgées de six mois ont été randomisées en deux groupes, l'un nourri avec des granulés alimentaires normaux (groupe non traité, N = 13), et un autre alimenté avec des granulés contenant de l'ATH434 (N = 14). Les granulés alimentaires ont été fournis par Specialty Feeds, Australie. Nous avons utilisé une dose quotidienne de 30 mg/kg comme indiqué dans les expériences précédentes chez la souris.<sup>11</sup> Des souris PLP- $\alpha$ -syn âgées de six mois ont été utilisées comme groupe de référence (N = 14). Des granulés alimentaires ont été fournis ad libitum aux animaux tout au long de l'expérience. Après 6 mois de traitement, une analyse comportementale a été réalisée suivie du sacrifice des animaux et de l'extraction du cerveau.

### 1.2 Challenging Beam Test <sup>1</sup>

Les performances motrices et la coordination ont été analysées avec une version modifiée du test de la poutrelle traditionnel adapté d'une méthode publiée précédemment. Des analyses comportementales ont été réalisées avec l'analyste en aveugle du traitement. Cinq performances par animal ont été enregistrées sur vidéo au départ (à 6 mois), et tous les 2 mois jusqu'à la fin du traitement (à 8, 10 et 12 mois), et le nombre de glissades par pas des membres postérieurs a été mesuré. La moyenne par animal a été utilisée pour les analyses statistiques.

### 1.3 Le Pole Test

Nous avons évalué la coordination et la bradykinésie de chaque souris à la fin de la période de traitement avec le test du poteau tel que décrit précédemment. Après une séance d'entraînement la veille du test, chaque souris a été placée la tête haute sur le sommet d'un poteau en bois. Nous avons enregistré le temps pour tourner vers le bas (T-turn) et le temps pour descendre le poteau de 50 cm (T-total) pour chaque animal. Cinq essais ont été réalisés avec chaque souris et les valeurs moyennes ont été calculées pour l'analyse statistique.



<sup>1</sup> Ces tests sont utilisés pour mesurer la coordination motrice, en particulier des membres postérieurs.

Les animaux sont entraînés et testés pour traverser une poutre étroite surélevée, suspendue entre une plate-forme de départ et la cage d'accueil des animaux. Le temps pour accomplir la tâche et le nombre de glissades de pied sont enregistrés. Le test est filmé et les paramètres sont évalués par un observateur qualifié.

## 1.4 Traitement des tissus

Après le test moteur final, les souris ont été perfusées par voie intracardiaque avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 7,4, Sigma) sous anesthésie profonde au thiopental et les cerveaux ont été extraits. Pour les analyses moléculaires, les mésencéphales de l'hémisphère droit ont été rapidement disséqués, congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Pour les analyses histologiques, les hémicerveaux gauches ont été post-fixés pendant une nuit dans du paraformaldéhyde à 4 % (pH 7,4, Sigma) à 4 °C. Après fixation, les cerveaux ont été lavés en PBS puis cryoprotégés dans 30% de saccharose (en PBS). Enfin, les cerveaux ont été congelés avec du 2-méthylbutane (Sigma) et conservés à -80°C.

## 1.5 Analyses immunohistologiques

Les cerveaux ont été découpés en série en coupes coronales de 40 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome de congélation (Leica) et conservés en flottaison libre dans un tampon cryoprotecteur à -20°C. Une série a été directement montée sur lames et colorée au crésyl-violet. Les sections flottantes ont été colorées selon des protocoles standard. Pour analyser le nombre de neurones dopaminergiques (neurones TH+) dans le SNc (système nerveux central) et les neurones épineux moyens (neurones DARPP32+) dans le striatum (STR), des coupes de cerveau représentatives ont été respectivement colorées avec un anticorps anti-tyrosine hydroxylase (TH) de lapin (1:1000, Millipore) et un anticorps de souris anti-DARPP32 (BD Bioscience; 1:2000).

Afin d'évaluer le nombre de GCI, l'activation microgliale et l'activité phagocytaire microgliale dans le SN, des sections représentatives du SN ont été respectivement colorées avec un anticorps anti-synucléine (pS129) de lapin anti-phosphorylé (1:1000, Abcam), un anti-CD11b de rat anticorps (1:200, BIORAD) et anticorps anti-CD68 de rat (1:200, BIORAD). Pour évaluer la présence d' $\alpha$ -syn au sein des lysosomes CD68+, une double immunocoloration a été réalisée avec un anticorps anti-syn agrégé, clone 5G4 (1:1000, Linaris) et un anticorps anti-CD68 (1:200, BIORAD). Les coupes ont ensuite été incubées avec des anticorps secondaires biotinylés suivis du réactif Vectastain ABC (Vector Laboratories) et de la 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) pour visualiser les sites de liaison immunohistochimiques. Les coupes colorées ont été montées sur des lames, déshydratées et recouvertes d'Entellan (Merck). Pour l'immunofluorescence, des IgG appropriées conjuguées avec Alexa 488 ou Alexa 594 (Life Technologies) ont été appliquées, suivies d'une coloration nucléaire avec du 4',6-Diamidin-2-phénylindol (DAPI, 1:1000, Sigma) et enfin recouvertes de milieu de montage Fluoromount -G (Biotech du Sud).

## 1.6 Détection du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) dans les cellules

Nous avons détecté et quantifié le fer ferrique disponible (Fe<sup>3+</sup>) dans des coupes de cerveau contenant le SNc de souris MSA traitées ou non traitées par ATH434 à l'aide d'un protocole de coloration au bleu de Prusse Perls selon le manuel du kit (kit HEMATOGNOST Fe® ; Merck, Darmstadt, Allemagne). Brièvement, les coupes ont été incubées dans une solution d'hexacyanoferrate de potassium [K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] dans HCl qui provoque la précipitation des tissus Fe<sup>3+</sup>, résultant en la coloration au bleu de Prusse (Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>). Les coupes ont été contre-colorées avec une solution Fast Red pour visualiser les noyaux cellulaires. Les lames ont été recouvertes d'une lamelle avant la quantification.

## 1.7 Analyses d'images

La neuroanatomie a été évaluée à l'aide d'un Mouse Brain Atlas. L'analyse stéréologique a été réalisée à l'aide du microscope Nikon E-800 équipé de l'appareil photo numérique Nikon DXM1200 et du logiciel Stereoinvestigator (Microbrightfield Europe eK) comme décrit précédemment. Le nombre de neurones TH+ dans le SNc et DARPP-32+ dans le STR ainsi que le nombre total de neurones dans la coloration au violet de crésyl (CV) a été mesuré en appliquant le flux de travail du fractionneur optique. La densité des GCI dans le SNc a été évaluée avec le scan des méandres et est exprimée en GCI/mm<sup>2</sup>.

Pour l'activation microgliale et l'évaluation de l'activité phagocytaire, les images SN ont été acquises avec un microscope à fluorescence (Leica DMI4000) et les zones positives CD11b et CD68 ont été estimées à l'aide d'ImageJ (National Institutes of Health). Les résultats sont présentés en pourcentage de la surface CD11b ou CD68 par surface totale de la section. Pour évaluer la présence d' $\alpha$ -syn dans les lysosomes CD68+, des images ont été acquises avec un microscope confocal (Zeiss LSM 700). La densité des profils positifs au bleu de Prusse dans le SNc a été estimée à l'aide du microscope Nikon E-800 équipé de l'appareil photo numérique Nikon DXM1200 et du logiciel Stereoinvestigator (Microbrightfield Europe e.K.). La densité des profils positifs au bleu de Prusse par zone a été définie dans le SNc à 40x et présentée en unités arbitraires (UA). Toutes les analyses morphométriques ont été effectuées par un observateur ignorant le traitement des animaux.

## 1.8 Analyses Western Blot

Des échantillons de mésencéphale frais congelés ont été homogénéisés dans un tampon d'extraction RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% acide désoxycholique, 1 mM EDTA ; Sigma) contenant des inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Roche). Les lysats ont été centrifugés (16 000 g pendant 15 minutes à 4°C) pour éliminer les débris et le surnageant a été collecté et stocké à -80°C. Les concentrations de protéines ont été déterminées avec le kit de dosage de protéines BCA (Sigma). Des quantités égales de protéines (30  $\mu$ g) par échantillon ont été soumises à une SDS-PAGE et à un transfert de Western en utilisant des procédures standard. Les anticorps primaires comprenaient l' $\alpha$ -synucléine anti-humaine (1:2000, Abcam), l' $\alpha$ -syn anti-phosphorylée dans Ser129 (1:1000, Abcam), l'anti-TNF $\alpha$  (1:1000, Abcam), l'anti-CD11B (1 : 1000, Abcam), anti-GFAP (1:2000, Life Technologies). L'anticorps contre GAPDH (1:5000, Sigma) a été utilisé comme témoin de charge. La détection du signal a été réalisée en utilisant des anticorps anti-lapin conjugués à HRP (1:20 000, Cell Signaling), anti-rat (1:20 000, Cell Signaling) et anti-souris (1:10 000, GE Healthcare). Les images ont été acquises à l'aide du système Fusion FX (Vilber Lourmat) pour l'imagerie Western blot et gel. Les niveaux relatifs de protéines étaient mesurés par densitométrie à l'aide du logiciel FUSION CAPT V16.09b (Vilber Lourmat). Un échantillon de référence a été chargé dans tous les gels pour la normalisation de gel à gel. Tous les gels ont été analysés, transférés, incubés et développés en parallèle.

## 1.9 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graph-Pad Prism 8 (Graphpad Software). Toutes les données sont exprimées en valeur moyenne  $\pm$  SD (écart-type) , sauf indication contraire. Pour tous les tests statistiques effectués, un niveau de probabilité de 5 % ( $P < 0,05$ ) a été considéré comme significatif. L'ANOVA à un facteur avec correction post hoc pour les comparaisons multiples a été utilisée pour les comparaisons multi-groupes. Un test t non apparié bilatéral a été effectué

pour les comparaisons à deux groupes. Les corrélations entre l'histopathologie, les données biochimiques et les variables comportementales ont été obtenues en utilisant des régressions linéaires.

## 2 Résultats

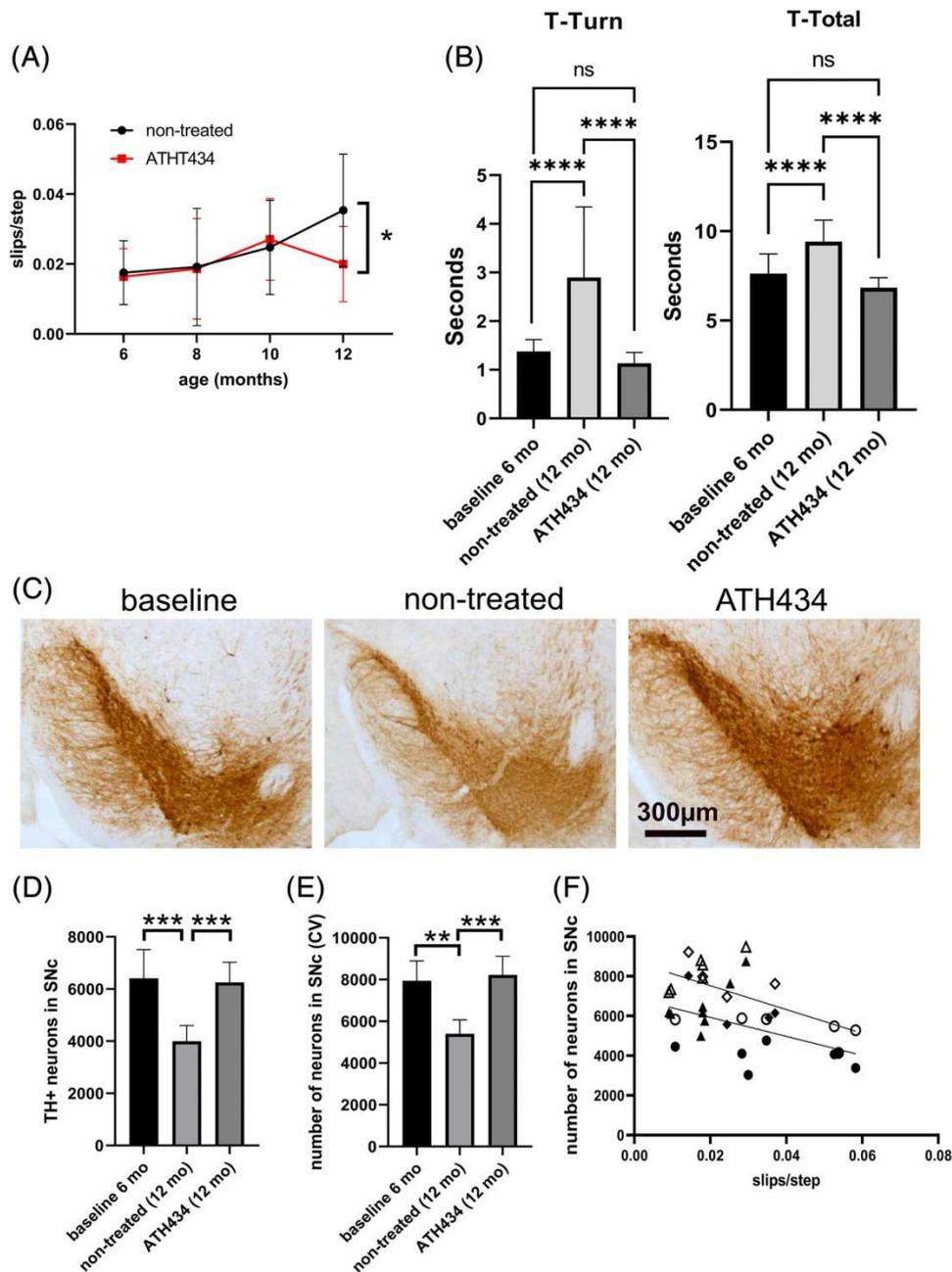
### 2.1 L'ATH434 préserve la fonction motrice et arrête la SND (dégénérescence striatonigrale) chez les souris PLP- $\alpha$ -Syn

Les souris PLP- $\alpha$ -Syn nourries avec ATH434 n'ont présenté aucun dysfonctionnement moteur à la fin du traitement par rapport aux souris nourries avec des granulés placebo (aliment normal, « non traité »), avec une réduction significative du nombre de glissades par étape dans le Beam test (Fig. 1A).

À la fin de la période de traitement, nous avons confirmé l'amélioration des performances motrices des souris PLP- $\alpha$ -Syn nourries avec ATH434 par rapport aux animaux non traités avec le test du pôle (Fig. 1B).

Associé à l'amélioration motrice, l'ATH434 a eu un effet neuroprotecteur dans le SNc (système nerveux central) (Fig. 1C-F). Le comptage stéréologique a montré un nombre similaire de neurones dopaminergiques (TH +) dans le SNc des souris traitées par rapport au groupe de base et une perte neuronale significative chez les souris non traitées (Fig. 1C, D).

Ces observations ont été confirmées par coloration CV (Fig. 1E). Il y avait une corrélation significative entre l'effet neuroprotecteur de l'ATH434 et l'amélioration motrice (neurones TH+ vs glissements par étape :  $R^2 = 0,21$ ,  $P = 0,0463$  ; neurones CV vs glissements par étape :  $R^2 = 0,39$ ,  $P = 0,0101$ ) (Fig. 1F).



**Fig 1**

L'ATH434 préserve les performances motrices et montre un effet neuroprotecteur dans la SNc chez les souris PLP- $\alpha$ -syn. **(A)** Glissements par étape quantifiés dans le beam test chez des souris traitées par ATH434 âgées de 6, 8, 10 et 12 mois (ATH434; carrés rouges) et non traitées (points noirs).  $N = 6-12$ . Les barres d'erreur indiquent SD (écart-type). Conception de mesures répétées, modèle à effets mixtes, test de comparaisons multiples de Sidak.  $*P < 0,05$ .

**(B)** Performance dans les pôles-tests au départ (6 mois ; barres noires) et 12 mois de souris non traitées (barres gris clair) et traitées à l'ATH434 (barres gris foncé) mesurées par le temps de virage en T (gauche panneau) et le temps T-total (panneau de droite).  $****P < 0,0001$ .

**(C)** Images représentatives des sections SN colorées contre TH. Barre d'échelle, 300  $\mu$ m.

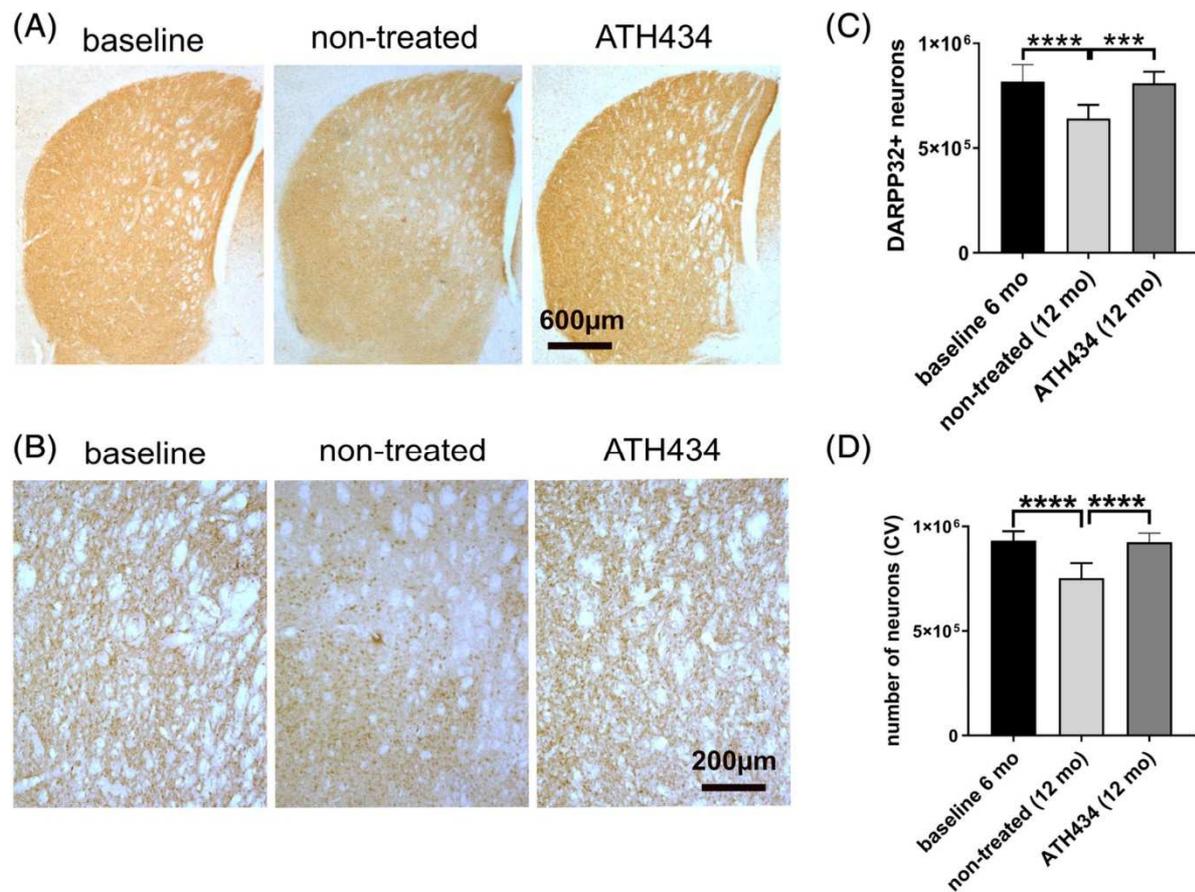
**(D)** Comptage stéréologique du nombre total de neurones dopaminergiques (TH+) dans l'ensemble du SNc dans les différents groupes.  $N = 4-8$ . **(E)** Comptage stéréologique du nombre total de neurones avec coloration crésyl-violet (CV) dans l'ensemble du SNc dans les différents groupes.  $N = 4-6$ . Les barres

d'erreur indiquent SD. Analyse de variance (ANOVA) : \*\*\*\* $P < 0,0001$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$  (test de Tukey). (F) Analyse de corrélation entre le nombre de TH+ [losanges noirs (ligne de base), cercles (non traités), triangles (traités ATH434) et CV (losanges blancs (ligne de base), cercles (non traités), triangles (ATH434)

ATH434 a également empêché la perte de neurones épineux moyens (MSN) dans le STR (striatum) (Fig. 2).

Le comptage stéréologique des MSN DARPP32+ a montré des nombres similaires chez les souris PLP- $\alpha$ -syn traitées par ATH434 et de base, tandis que les animaux non traités ont subi une réduction significative du nombre de MSN au cours de la période expérimentale de six mois (Fig. 2A-C).

La protection neuronale dans STR a été confirmée par coloration CV (Fig. 2D).



**Fig 2**

ATH434 empêche la neurodégénérescence dans le STR des souris PLP- $\alpha$ -syn.

(A) Images représentatives des sections du striatum (STR) colorées contre DARPP32. Barre d'échelle, 600  $\mu$ m.

(B) Sections du striatum à un grossissement plus élevé. Barre d'échelle, 200  $\mu$ m.

(C) Nombre de neurones DARPP32+ dans l'ensemble du STR des différents groupes. N = 7-10.

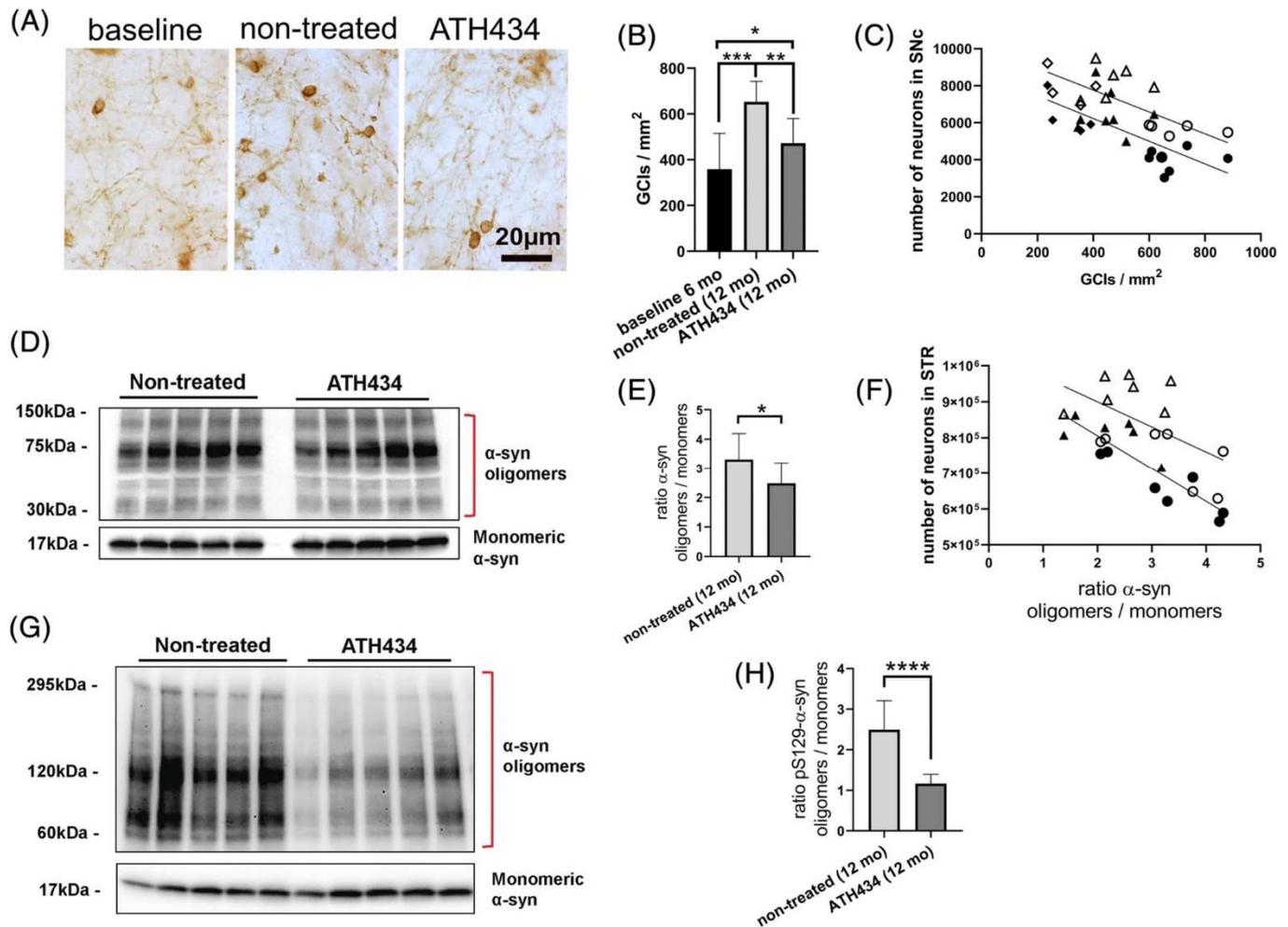
(D) Neurones CV dans l'ensemble du STR des différents groupes. N = 8-11. Les barres d'erreur indiquent SD. Analyse de variance (ANOVA) : \*\*\*\* $P < 0,0001$ , \*\*\* $P < 0,001$  (test de Tukey).

## 2.2 ATH434 réduit l'agrégation $\alpha$ -Syn chez les souris PLP- $\alpha$ -Syn

Des découvertes antérieures ont démontré la capacité de l'ATH434 à moduler l'agrégation  $\alpha$ -syn in vitro et in vivo ; par conséquent, nous avons évalué son potentiel à réduire l'accumulation d' $\alpha$ -syn chez les

souris AMS. L'analyse immunohistologique a montré une réduction significative des inclusions de type GCI dans le SNc des souris traitées par ATH434 par rapport aux animaux non traités, avec des niveaux similaires au groupe de base (Fig. 3A, B).

De plus, la diminution des agrégats  $\alpha$ -syn était significativement corrélée à l'effet neuroprotecteur observé dans le SNc (neurones TH+ vs densité GCI :  $R^2 = 0,47$ ,  $P = 0,0012$  ; neurones CV vs densité GCI :  $R^2 = 0,46$ ,  $P = 0,004$ ) (Fig. 3C).



**Fig 3**

*ATH434 réduit l'agrégation  $\alpha$ -syn.*

**(A)** Images représentatives de sections SN colorées pour pS129  $\alpha$ -syn pour identifier les agrégats de type GCI. Barre d'échelle, 20  $\mu$ m.

**(B)** Densité GCI en SN exprimée en GCI/mm<sup>2</sup>. N = 12-14. Les barres d'erreur indiquent SD. Analyse de variance (ANOVA) : \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  (test de Tukey).

**(C)** Analyse de corrélation entre le nombre de TH+ [losanges noirs (ligne de base), cercles (non traités), triangles (traités ATH434)] ou CV [losanges blancs (ligne de base), cercles (non traités), triangles (ATH434 -traités)] neurones et densité GCI dans le SNc. Analyse de régression linéaire simple. Neurones TH+ versus densité GCI :  $R^2 = 0,47$ ,  $P = 0,0012$  ; Neurones CV versus densité GCI,  $R^2 = 0,46$ ,  $P = 0,004$ .

**(D)** Blots représentatifs montrant les niveaux de monomères  $\alpha$ -syn (panneau inférieur; temps d'exposition court) et d'espèces oligomères  $\alpha$ -syn (panneau supérieur; temps d'exposition long) dans le mésencéphale

des souris non traitées et traitées à l'ATH434. Les voies individuelles représentent des homogénats cérébraux de souris individuelles.

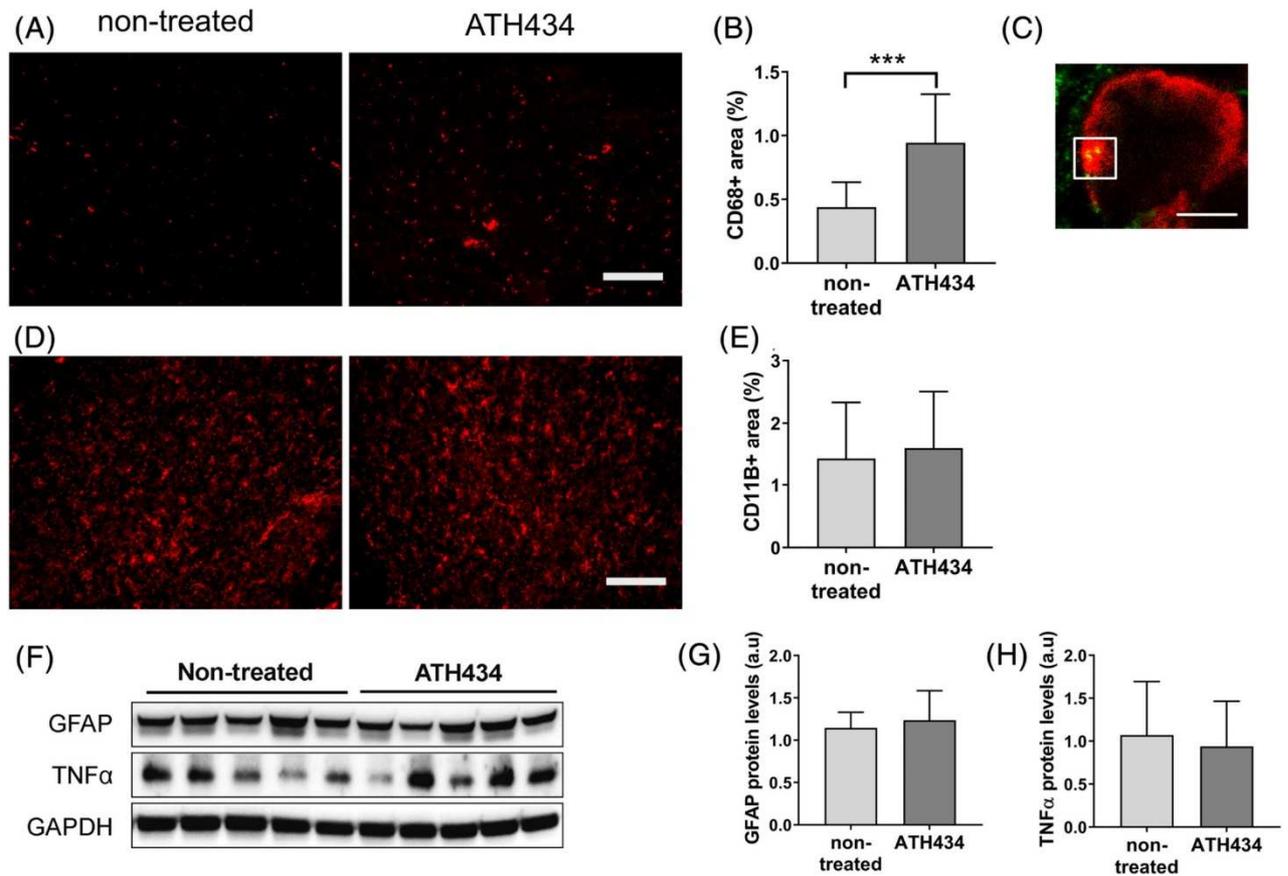
(E) Quantification du rapport des oligomères  $\alpha$ -syn par rapport aux espèces monomères.  $N = 9$ . Les barres d'erreur indiquent SD. Test t non apparié,  $*P < 0,05$ .

(F) Analyse de corrélation du rapport oligomère/monomère  $\alpha$ -syn et des neurones striataux. Régression linéaire simple. Neurones DARPP32+ dans STR versus rapport oligomères/monomères  $\alpha$ -syn [cercles noirs (non traités) et triangles (traités ATH434)] :  $R2 = 0,75$ ,  $P = 0,0001$  ; Neurones CV dans STR versus rapport oligomères/monomères  $\alpha$ -syn [cercles blancs (non traités) et triangles (traités ATH434)] :  $R2 = 0,30$ ,  $P = 0,0426$ .

(G) Blots représentatifs montrant les niveaux de  $\alpha$ -syn phosphorylé à Ser129 (pS129): monomères (panneau inférieur; temps d'exposition court) et espèces oligomères (panneau supérieur; temps d'exposition long) dans le mésencéphale des souris non traitées et traitées à l'ATH434. Les voies individuelles représentent des homogénats cérébraux de souris individuelles.

(H) Quantification du rapport des oligomères pS129- $\alpha$ -syn par rapport aux espèces monomères.  $N = 9$ . Les barres d'erreur indiquent SD. Test t non apparié,  $****P < 0,0001$ .

En plus de l'effet sur le nombre d'inclusions, l'analyse « western blot » a montré une réduction significative du rapport des oligomères  $\alpha$ -syn totaux et phosphorylés par rapport au monomère chez les souris traitées par ATH434 par rapport au groupe non traité (Fig. 3D-H). Ainsi, les résultats ont confirmé l'effet modulateur de l'ATH434 sur l'oligomérisation de l' $\alpha$ -syn, avec un passage de l' $\alpha$ -syn oligomère au monomère  $\alpha$ -syn chez les animaux traités. Fait intéressant, des niveaux plus faibles d'espèces oligomères  $\alpha$ -syn totales étaient significativement corrélées avec le sauvetage des neurones striataux (neurones DARPP32+ dans STR vs rapport oligomères/monomères  $\alpha$ -syn :  $R2 = 0,75$ ,  $P = 0,0001$  ; neurones CV dans STR vs  $\alpha$ - rapport oligomères/monomères syn :  $R2 = 0,30$ ,  $P = 0,0426$ ) (Fig. 3F).



**Fig 4**

Les souris traitées à l'ATH434 présentent une augmentation de l'activation phagocytaire microgliale.

(A) Images d'immunofluorescence représentatives de sections SN colorées contre CD68. Barre d'échelle, 150  $\mu$ m.

(B) Zone CD68 positive (CD68+) dans les différents groupes exprimée en % de la surface totale du SN. N = 12-14. Les barres d'erreur indiquent SD. Test t non apparié, \*\*\*P < 0,001.

(C) Microscopie confocale représentative de la co-localisation de -syn (vert) et CD68 (rouge) dans les lysosomes microgliaux (structures en forme de points dans la boîte blanche). Barre d'échelle, 5  $\mu$ m.

(D) Images d'immunofluorescence représentatives de sections SN colorées contre CD11b. Barre d'échelle, 150  $\mu$ m.

(E) Zone CD11B positive (CD11b+) dans les différents groupes exprimée en % de la surface totale du SN. N = 12-14. Les barres d'erreur indiquent SD.

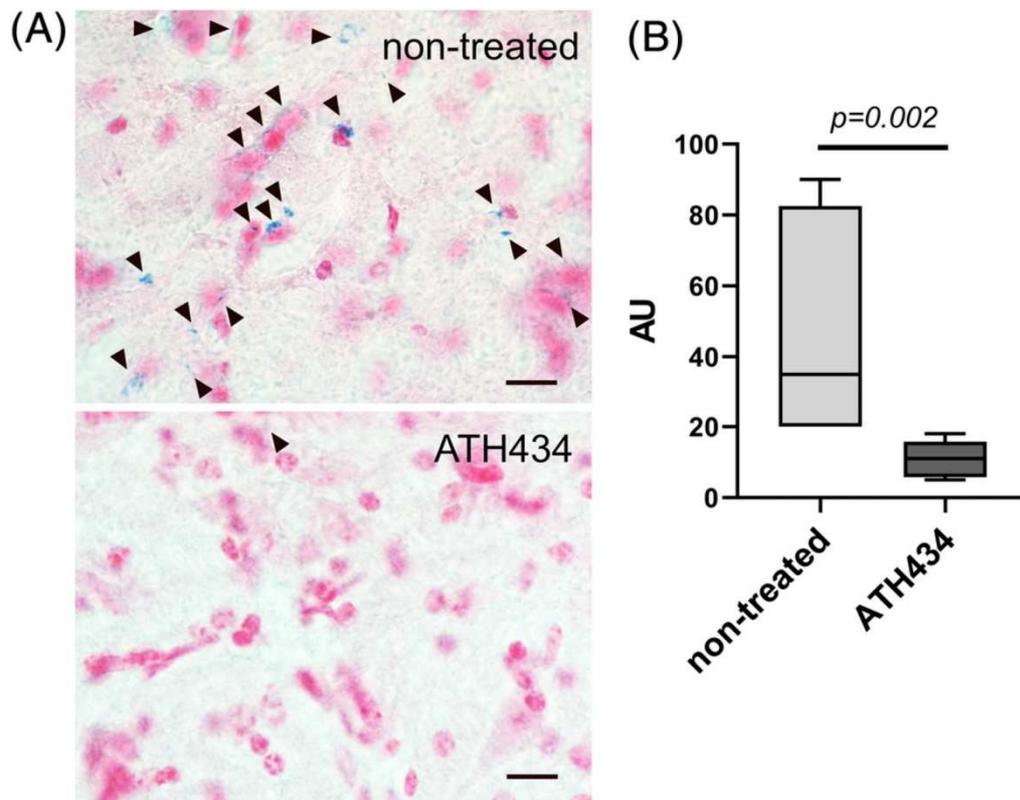
(F) Transferts représentatifs montrant les niveaux de GFAP, TNF $\alpha$  et GAPDH dans le mésencéphale de souris non traitées et traitées par ATH434. GAPDH a été utilisé comme témoin de charge. Les voies individuelles représentent des homogénats cérébraux de souris individuelles.

(G, H) Quantification des niveaux de protéines GFAP et TNF $\alpha$  dans le mésencéphale de souris non traitées et traitées par ATH434. Les données sont affichées en unités arbitraires (a.u.). N = 9-10. Les barres d'erreur indiquent SD.

## 2.4 ATH434 réduit le niveau de fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) dans le SNc des souris PLP- $\alpha$ -Syn

Pour évaluer le Fe<sup>3+</sup> dans le SNc des souris PLP- $\alpha$ -syn, nous avons appliqué une coloration prussienne Perls classique et estimé la distribution des précipités bleus résultants chez les souris AMS non traitées

par rapport aux souris AMS traitées par ATH434. Chez les souris SNc PLP- $\alpha$ -syn à l'âge de 12 mois, le Fe<sup>3+</sup> intracellulaire (Fig. 5A) était significativement réduit après le traitement avec l'ATH434, un chélateur du fer d'affinité modérée connu.



**Fig 5**

*Le traitement par ATH434 diminue les niveaux de fer ferrique dans le cerveau des souris PLP- $\alpha$ -syn.*

*(A) Coloration au bleu de Prusse Perls pour détecter le Fe<sup>3+</sup> cellulaire; des précipités bleus (flèches) sont dispersés dans le SNc de souris PLP- $\alpha$ -syn non traitées, mais sont rarement identifiés chez les animaux traités par ATH434. Barres d'échelle, 10  $\mu$ m.*

*(B) Graphique en boîte et en moustaches avec le test de Mann-Whitney pour comparer le niveau estimé de précipités bleus chez les souris non traitées et traitées à l'ATH434. N = 6.*

### 3 Discussion

Bien que l'origine et le rôle exact des inclusions fibrillaires d' $\alpha$ -syn et des espèces oligomères solubles dans l'AMS soient encore en discussion, plusieurs études in vivo et in vitro ont montré la capacité de l' $\alpha$ -syn pathologique à se propager à travers le SNC, à induire dysfonctionnement cellulaire, neuroinflammation, symptômes moteurs et neurodégénérescence. Sur la base de ces preuves et des résultats d'études précliniques, de nombreux essais cliniques en cours se concentrent sur le ciblage ou la modulation de l'oligomérisation et de l'agrégation de l' $\alpha$ -syn.<sup>6</sup>

En particulier, l'utilisation de petites molécules qui modulent l'accumulation de l' $\alpha$ -syn présente de nombreux avantages tels que leur biodisponibilité orale élevée, la pénétration de la barrière hémato-encéphalique, leur capacité à agir à l'intérieur des cellules et un potentiel thérapeutique prometteur dans

les modèles précliniques d' $\alpha$ -synucléonopathies en réduisant les inclusions d' $\alpha$ -syn, la neurodégénérescence et en améliorant la fonction motrice.

Nous montrons que la petite molécule ATH434, un nouvel inhibiteur quinazolinone de l'accumulation de protéines  $\alpha$ -syn médiée par le fer, réduit les inclusions de type GCI et les espèces oligomères d' $\alpha$ -syn chez les souris AMS.

Nous montrons également que l'ATH434 a un effet neuroprotecteur dans le STR et le SNc des souris PLP- $\alpha$ -syn, empêchant la perte de neurones épineux moyens et dopaminergiques respectivement dans ces régions cérébrales. À cet égard, il y avait une corrélation significative entre la réduction des inclusions de type GCI dans le SNc, l'effet neuroprotecteur dopaminergique dans le SNc et l'amélioration motrice. Par conséquent, nos résultats suggèrent que l'effet neuroprotecteur de l'ATH434 dans cette région du cerveau et sur la fonction motrice est associé à son effet modulateur sur l'agrégation d' $\alpha$ -syn.

Nous avons également identifié un changement d'espèces oligomères vers des espèces  $\alpha$ -syn monomériques chez les souris traitées à l'ATH434 avec une diminution significative des formes phosphorylées pathologiques de haut poids moléculaire.

Ces résultats, ainsi que la plus faible densité observée de GCI chez les animaux traités, suggèrent que **l'effet ATH434 est lié à la prévention de la formation de nouveaux agrégats d' $\alpha$ -syn au cours de la progression de la maladie plutôt qu'à la désagrégation des agrégats déjà existants au début de la thérapie.**

Fait intéressant, il y avait une corrélation significative entre la réduction des oligomères  $\alpha$ -syn et l'effet neuroprotecteur de l'ATH434 dans le STR, suggérant que les espèces pathogènes solubles d' $\alpha$ -syn solubles peuvent contribuer à la dégénérescence du système nerveux chez les souris AMS.

Nos données corroborent les observations d'une étude précédente, où l'ATH434 réduisait l'agrégation d' $\alpha$ -syn in vitro et in vivo.<sup>11</sup> amélioration des symptômes moteurs. Ces effets ont été associés à une diminution du stress oxydatif, du fer SNc et à une réduction des espèces pathologiques  $\alpha$ -syn<sup>11</sup>. .

Nos données corroborent les observations d'une étude précédente, où l'ATH434 réduisait l'agrégation d' $\alpha$ -syn in vitro et in vivo. Ces effets ont été associés à une diminution du stress oxydatif, du fer SNc et à une réduction des espèces pathologiques  $\alpha$ -syn. Dans ce travail antérieur, l'administration d'ATH434 dans des modèles murins transgéniques et basés sur des toxines de MP a empêché la perte de neurones dopaminergiques dans le SNc et amélioré les symptômes moteurs.

Ces effets étaient associés à une diminution du stress oxydatif, du fer SNc et à une réduction des espèces pathologiques d' $\alpha$ -syn. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'ATH434 est capable de moduler l'accumulation d' $\alpha$ -syn dans différentes conditions pathologiques, conduisant à une neuroprotection et à une amélioration motrice.

Les souris PLP- $\alpha$ -syn récapitulent l'histoire naturelle de l'AMS-P humaine, développant un dégénérescence du système nerveux et une neuroinflammation avec le vieillissement, entre autres troubles. Aux premiers stades (âgés de 2 mois et plus), ces animaux présentent des inclusions de type GCI dans le cerveau sans signes de neuroinflammation, de neurodégénérescence ou de symptômes moteurs. Cependant, avec le vieillissement, les souris AMS développent une neurodégénérescence progressive dans les aires motrices qui devient évidente à l'âge de 4 à 6 mois dans le SNc et à 12 mois dans le striatum, accompagnée d'une formation d'oligomères d' $\alpha$ -syn, d'une neuroinflammation progressive et d'un dysfonctionnement moteur.

**Considérant que les patients atteints d'AMS sont généralement diagnostiqués une fois que les symptômes moteurs sont apparus et que le processus neurodégénératif a commencé, nous avons décidé d'administrer ATH434 à des souris AMS à l'âge de 6 mois, lorsque les symptômes moteurs initiaux sont déjà présents, et d'évaluer son potentiel thérapeutique sur la progression de la maladie jusqu'à l'âge de 12 mois. Le fait que l'ATH434 ait pu stopper la dégénérescence du système nerveux et préserver la fonction motrice à ce stade de la maladie chez les souris AMS constitue une justification prometteuse pour les futurs essais cliniques dans l'AMS.**

Ici, nous montrons également que les souris traitées à l'ATH434 présentaient une augmentation du marqueur lysosomal microglial CD68. Cela nous a incités à caractériser davantage l'état neuro-inflammatoire des animaux recevant l'ATH434. L'évaluation moléculaire et histologique a démontré que l'augmentation de l'immunoréactivité du CD68 observée chez les souris traitées à l'ATH434 n'était pas associée à une augmentation supplémentaire de l'astrogliose, de la microgliose ou des marqueurs pro-inflammatoires. En revanche, nous avons observé une corrélation positive entre les niveaux de CD68 dans le SN et l'effet neuroprotecteur de l'ATH434, et une corrélation négative entre les inclusions et les oligomères de CD68 et d' $\alpha$ -syn. De plus, nous avons démontré la présence d' $\alpha$ -syn pathologique dans les lysosomes CD68+ de la microglie. Ainsi, les résultats soutiennent une augmentation de l'activité phagocytaire microgliale liée au moins en partie à la clairance d' $\alpha$ -syn par la voie lysosomale<sup>4</sup>, sans augmentation supplémentaire de la signalisation pro-inflammatoire toxique dans le cerveau des souris AMS recevant une thérapie ATH434.

L'accumulation de fer constitue une autre caractéristique pathologique de l'AMS. Plusieurs études ont démontré des niveaux accrus de fer dans les zones du cerveau touchées par la maladie. L'augmentation du fer dans le SN est également une caractéristique des modèles précliniques de MP. De plus, des études précliniques ont montré que, soit par interaction directe, soit indirectement (c'est-à-dire par la génération de stress oxydatif), le fer est capable d'induire l'agrégation d' $\alpha$ -syn.

Ici, nous montrons que le fer ferrique dans le SNc des souris PLP- $\alpha$ -syn est abaissé par le traitement ATH434, similaire aux observations précédentes dans un modèle murin de MP dans lequel ATH434 réduisait les élévations de fer induites par la MPTP<sup>2</sup>.

Pris ensemble, ces nouveaux résultats fournissent la première preuve de l'implication possible du fer dans le processus de neurodégénérescence dans le modèle murin PLP- $\alpha$ -syn. D'autres études seront cependant nécessaires pour caractériser les stades de l'implication du fer au cours de la progression de la maladie. Nos résultats corroborent les effets neuroprotecteurs de l'ATH434 dans l' $\alpha$ -synucléinopathie, qui peuvent être attribués à son activité de chélateur du fer ainsi qu'à son effet sur la limitation de l'agrégation d' $\alpha$ -syn.

En résumé, notre étude confirme le potentiel neuroprotecteur de l'ATH434 précédemment observé dans les modèles de MP et indique que l'administration orale de l'ATH434, qui vient de terminer un essai de phase I chez des volontaires sains, pourrait constituer une stratégie thérapeutique prometteuse pour ralentir la progression de la maladie dans l'AMSA, soutenir le développement ultérieur d'essais cliniques chez l'homme avec des patients souffrant d'AMS ou de -synucléinopathies apparentées.

---

<sup>2</sup> Le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine) est une neurotoxine qui provoque les symptômes permanents de la maladie de Parkinson en détruisant certains neurones dans la substantia nigra du cerveau. Il est utilisé pour étudier la maladie dans les modèles animaux.

# ATH434 Reduces $\alpha$ -Synuclein-Related Neurodegeneration in a Murine Model of Multiple System Atrophy

[Antonio Heras-Garvin PhD](#), [Violetta Refolo PhD](#), [Claudio Schmidt MSc](#), [Katja Malfertheiner BSc](#), [Gregor K. Wenning MD, PhD](#), [Margaret Bradbury PhD](#), [David Stamler MD](#), [Nadia Stefanova MD, PhD](#)

First published: 08 July 2021

<https://doi.org/10.1002/mds.28714>

Antonio Heras-Garvin and Violetta Refolo contributed equally to this article.

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: MB and DS are employees of Alterity Therapeutics. AHG, VR, CS, KM, GW and NS declare no conflict of interest.

Funding agency: The study was supported by research grant of Alterity Therapeutics and grants of the Austrian Science Fund (FWF) F4414 and W1206-08.

## ABSTRACT

### Background

Multiple system atrophy (MSA) is a fatal neurodegenerative disorder characterized by aggregated  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) in oligodendrocytes and accompanied by striatonigral and olivopontocerebellar degeneration and motor symptoms. Key features of MSA are replicated in the PLP- $\alpha$ -syn transgenic mouse, including progressive striatonigral degeneration and motor deterioration. There are currently no approved treatments for MSA. ATH434 is a novel, orally bioavailable brain penetrant small molecule inhibitor of  $\alpha$ -syn aggregation.

### Objectives

To characterize ATH434 for disease modification in a mouse model of MSA.

### Methods

Six-month-old PLP- $\alpha$ -syn mice (MSA mice) were ATH434-treated (ATH434 in food) or untreated (normal food) for 6 months. Motor behavior and numbers of nigral and striatal neurons were evaluated.  $\alpha$ -syn aggregates and oligomers were quantified by immunohistochemical and western blot analyses. Microglial activation and neuroinflammation were assessed by histological and molecular analyses. Ferric iron in the Substantia nigra was evaluated with the Perls method.

### Results

ATH434-treated mice demonstrated preservation of motor performance in MSA mice that was associated with neuroprotection of nigral and striatal neurons. The rescue of the phenotype correlated with the reduction of  $\alpha$ -syn inclusions and oligomers in animals receiving ATH434. ATH434-treated mice exhibited significantly increased lysosomal activity of microglia without increased pro-inflammatory markers, suggesting a role in  $\alpha$ -syn clearing. ATH434-treatment was associated with lower intracellular nigral iron levels.

## Conclusions

Our findings demonstrate the beneficial disease-modifying effect of ATH434 in oligodendroglial  $\alpha$ -synucleinopathy on both the motor phenotype and neurodegenerative pathology in the PLP- $\alpha$ -syn transgenic mouse and support the development of ATH434 for MSA. © 2021 The Authors. *Movement Disorders* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of International Parkinson and Movement Disorder Society

Multiple system atrophy (MSA) is a rare neurodegenerative disorder clinically characterized by autonomic failure and progressive motor impairment.<sup>1</sup> MSA pathological hallmarks include the abnormal accumulation of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) mainly in the cytoplasm of oligodendrocytes, forming the so-called glial cytoplasmic inclusions (GCI), accompanied by striatonigral degeneration (SND) in the parkinsonian variant of the disease (MSA-P) and by olivopontocerebellar atrophy (OPCA) in the cerebellar variant (MSA-C).<sup>1</sup> MSA is a fatal disorder, leading to death a few years after symptom onset, with no treatment available.<sup>2</sup> Similar to Parkinson's disease (PD), the abnormal aggregation and accumulation of  $\alpha$ -syn in MSA is associated with glial and neuronal dysfunction, neuroinflammation and neurodegeneration,<sup>3,4</sup> however the origin of  $\alpha$ -syn inclusions in MSA is still unknown. Numerous publications have recently shown the ability of  $\alpha$ -syn to be transferred from cell to cell and spread in a prion-like manner<sup>5</sup> and, therefore, the inhibition of  $\alpha$ -syn aggregation constitutes a promising therapeutic strategy in  $\alpha$ -synucleinopathies.<sup>6</sup> The use of small molecules to target  $\alpha$ -syn aggregation has shown promising results in pre-clinical models of PD and MSA,<sup>7-13</sup> supporting their use in current clinical trials. ATH434, formerly PBT434, is a novel orally bioavailable and brain penetrant small molecule that is able to inhibit  $\alpha$ -syn aggregation. ATH434 has an iron binding affinity competitive for  $\alpha$ -syn but not for endogenous iron trafficking proteins.<sup>11</sup> In a previous study, the use of this compound prevented loss of neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc), lowered nigral  $\alpha$ -synuclein accumulation and nigral iron levels, and rescued motor performance in animal models of PD.<sup>11</sup> Therefore, ATH434 could constitute a promising compound to attenuate disease progression in MSA.

The PLP- $\alpha$ -syn transgenic mouse model of MSA recapitulates many of the clinical and pathological features observed in patients by overexpressing human  $\alpha$ -syn under the oligodendrocytic PLP (proteolipid protein) gene promoter.<sup>14</sup> These mice develop GCI-like aggregates, autonomic failure, progressive SND and motor impairment,<sup>14-21</sup> recapitulating the natural history of the human disease.<sup>22</sup> Thus, this animal model constitutes a valuable preclinical tool to evaluate the effect of disease modification therapies for MSA. In the present preclinical study, we evaluated the efficacy of ATH434 in PLP- $\alpha$ -syn mice to alter the performance in motor tasks, to change the progression of SND, the density of GCI-like aggregates and the level of  $\alpha$ -syn oligomers.

## 1 Material and Methods

### 1.1 Animals and Treatments

PLP- $\alpha$ -syn mice were kept under temperature-controlled pathogen-free conditions with a light/dark 12 hours cycle. All experiments were performed according to the ethical guidelines with the permission of the Austrian Federal Ministry of Science and Research (BMBWF-66.011/0080-V/3b/2019). Six-month-old PLP- $\alpha$ -syn mice were randomized in two groups, one fed with normal food pellets (non-treated group, N = 13), and another fed with pellets containing ATH434 (N = 14). Food pellets were provided by Specialty Feeds, Australia. We used a daily dose of 30 mg/kg as reported in previous experiments in mice.<sup>11</sup> Six-month-old PLP- $\alpha$ -syn mice were used as a baseline group (N = 14). Food pellets were provided *ad libitum* to the animals throughout the whole experiment. After 6 months of

treatment, behavioral analysis was performed followed by the sacrifice of the animals and brain extraction.

## 1.2 Challenging Beam Test

Motor performance and coordination were analyzed with a modified version of the traditional beam test adapted from a previously published method.<sup>23, 24</sup> Behavioral analyses were performed with the analyst blinded to the treatment. Five performances per animal were video recorded at baseline (6 months of age), and every 2 months until the end of the treatment (at 8, 10 and 12 months of age), and the number of slips per step with the hind limbs was measured. The mean per animal was used for statistical analyses.

## 1.3 Pole Test

We assessed the coordination and bradykinesia of each mouse at the end of the treatment period with the pole test as described previously.<sup>22</sup> After a training session the day before testing, each mouse was placed with the head up on the top of a wooden pole. We recorded time to turn downward (T-turn) and the time to climb down the 50 cm-pole (T-total) for each animal. Five trials were performed with each mouse and mean values were calculated for the statistical analysis.

## 1.4 Tissue Processing

After the final motor test, mice were perfused intracardially with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Sigma) under deep thiopental anesthesia and brains were extracted. For molecular analyses midbrains were quickly dissected from the right hemisphere, snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For histological analyses, left hemibrains were post-fixed overnight in 4% paraformaldehyde (pH 7.4, Sigma) at  $4^{\circ}\text{C}$ . After fixation, brains were washed in PBS and then cryoprotected in 30% sucrose (in PBS). Finally, brains were frozen using 2-methylbutane (Sigma) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 1.5 Immunohistological Analyses

Brains were serially cut in  $40\ \mu\text{m}$ -thick coronal sections using a freezing microtome (Leica) and stored free-floating in a cryoprotectant buffer at  $-20^{\circ}\text{C}$ . One series was directly mounted on slides and stained with cresyl-violet. Free-floating sections were stained following standard protocols. To analyze the number of dopaminergic neurons (TH+ neurons) in the SNc and medium spiny neurons (DARPP32+ neurons) in the striatum (STR), representative brain sections were respectively stained with rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (1:1000, Millipore) and mouse anti-DARPP32 antibody (BD Bioscience; 1:2000). In order to evaluate the number of GCIs, microglial activation and microglial phagocytic activity in the SN, representative sections of SN were respectively stained with rabbit anti-phosphorylated  $\alpha$ -synuclein (pS129) antibody (1:1000, Abcam), rat anti-CD11b antibody (1:200, BIORAD) and rat anti-CD68 antibody (1:200, BIORAD). To evaluate the presence of  $\alpha$ -syn within CD68+ lysosomes, double immunostaining was performed with anti-aggregated  $\alpha$ -syn antibody, clone 5G4 (1:1000, Linaris) and anti-CD68 antibody (1:200, BIORAD). Sections were then incubated with biotinylated secondary antibodies followed by Vectastain ABC reagent (Vector Laboratories) and 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) to visualize the immunohistochemical binding sites. Stained sections were mounted on slides, dehydrated and coverslipped with Entellan (Merck). For immunofluorescence, suitable IgGs conjugated with Alexa 488 or Alexa 594 (Life Technologies) were applied, followed by nuclear staining with 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:1000, Sigma) and finally coverslipped with mounting medium Fluoromount-G (Southern Biotech).

## 1.6 Detection of Ferric Iron (Fe<sup>3+</sup>) in Cells

We detected and quantified available ferric iron (Fe<sup>3+</sup>) in brain sections containing the SNc of ATH434-treated or untreated MSA mice using a Perls Prussian blue staining protocol as per the kit's manual (HEMATOGNOST Fe® kit; Merck, Darmstadt, Germany). Briefly, the sections were incubated in a solution of potassium hexacyanoferrate [K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] in HCl which causes tissue Fe<sup>3+</sup> to precipitate, resulting in the Prussian blue stain (Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>). The sections were counterstained with a Fast Red solution to visualize the cellular nuclei. Slides were coverslipped prior to quantification.

## 1.7 Image Analyses

Neuroanatomy was assessed using a Mouse Brain Atlas. Stereological analysis was performed using the Nikon E-800 microscope equipped with Nikon digital camera DXM1200 and Stereoinvestigator software (Microbrightfield Europe e.K) as described previously.<sup>25</sup> The number of TH<sup>+</sup> neurons in the SNc and DARPP-32<sup>+</sup> in the STR as well as the total number of neurons in cresyl violet (CV) staining were measured by applying the optical fractionator workflow.<sup>22</sup> The density of GCIs in the SNc was assessed with the meander scan and is expressed in GCI/mm<sup>2</sup>. For microglial activation and phagocytic activity assessment, SN images were acquired with a fluorescence microscope (Leica DMI4000) and the CD11b and CD68 positive areas were estimated using ImageJ (National Institutes of Health). Results are presented as percentage of CD11b or CD68 area per total section area. To evaluate the presence of α-syn within CD68<sup>+</sup> lysosomes, images were acquired with a confocal microscope (Zeiss LSM 700). The density of Prussian blue-positive profiles in the SNc was estimated applying the Nikon E-800 microscope equipped with Nikon digital camera DXM1200 and Stereoinvestigator software (Microbrightfield Europe e.K). The density of Prussian-blue-positive profiles per area was defined in the SNc at 40x and presented as arbitrary units (AU). All morphometric analyses were done by an observer blinded to the treatment of the animals.

## 1.8 Western Blot Analyses

Fresh frozen midbrain samples were homogenized in RIPA extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 1 mM EDTA; Sigma) containing protease and phosphatase inhibitors (Roche). The lysates were centrifuged (16,000g for 15 minutes at 4°C) to remove debris and the supernatant was collected and stored at -80°C. Protein concentrations were determined with BCA Protein Assay Kit (Sigma). Equal amounts of protein (30 µg) per sample were subjected to SDS-PAGE and western blotting following using standard procedures. Primary antibodies included anti-human α-synuclein (1:2000, Abcam), anti-phosphorylated α-syn in Ser129 (1:1000, Abcam), anti-TNFα (1:1000, Abcam), anti-CD11B (1:1000, Abcam), anti-GFAP (1:2000, Life Technologies). Antibody against GAPDH (1:5000, Sigma) was used as loading control. Signal detection was performed using HRP-conjugated anti-rabbit (1:20,000, Cell Signaling), anti-rat (1:20,000, Cell Signaling) and anti-mouse (1:10,000, GE Healthcare) antibodies. Images were acquired using the Fusion FX system (Vilber Lourmat) for Western blot and gel imaging. Relative protein levels were measured by densitometry using FUSION CAPT V16.09b software (Vilber Lourmat). A reference sample was loaded in all gels for gel-to-gel normalization. All gels were run, transferred, incubated and developed in parallel.

## 1.9 Statistical Analyses

All statistical analyses were conducted using the software Graph-Pad Prism 8 (Graphpad Software). All data are expressed as mean value ± SD, if not indicated otherwise. For all statistical tests performed, a probability level of 5% (*P* < 0.05) was considered significant. One-way ANOVA with post hoc correction

for multiple comparisons was used for multi-group comparisons. Two-tailed unpaired t test was performed for two-group comparisons. Correlations between histopathology, biochemical data and behavioral variables were obtained by using linear regressions.

## 2 Results

### 2.1 ATH434 Preserves Motor Function and Halts SND in the PLP- $\alpha$ -Syn Mice

PLP- $\alpha$ -Syn mice fed with ATH434 exhibited no motor dysfunction at the end of the treatment compared to mice fed with placebo pellets (normal food, “non-treated”), with a significant reduction in the number of slips per step in the challenging beam test (Fig. 1A). At the end of the treatment period, we confirmed the improved motor performance of PLP- $\alpha$ -Syn mice fed with ATH434 as compared to non-treated animals with the pole test (Fig. 1B). Associated with the motor improvement, ATH434 had a neuroprotective effect in SNc (Fig. 1C–F). Stereological counting showed a similar number of dopaminergic (TH+) neurons in the SNc of treated mice compared to the baseline group and a significant neuronal loss in non-treated mice (Fig. 1C,D). These observations were confirmed by CV staining (Fig. 1E). There was a significant correlation between the neuroprotective effect of ATH434 and the motor improvement (TH+ neurons vs. slips per step:  $R^2 = 0.21$ ,  $P = 0.0463$ ; CV neurons vs. slips per step:  $R^2 = 0.39$ ,  $P = 0.0101$ ) (Fig. 1F).

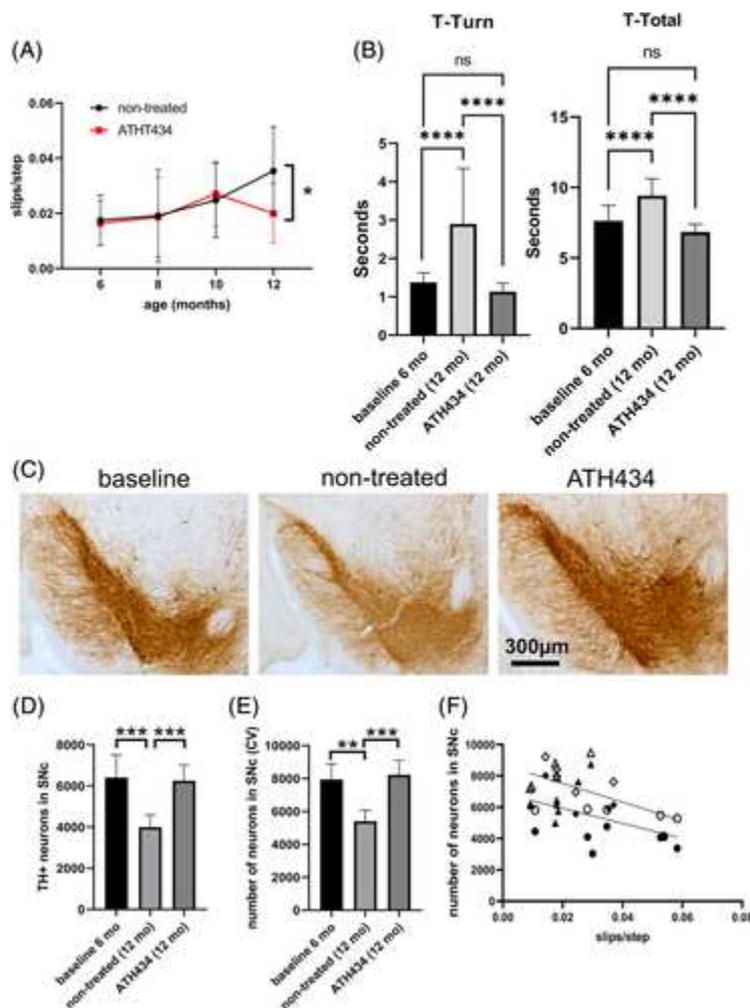
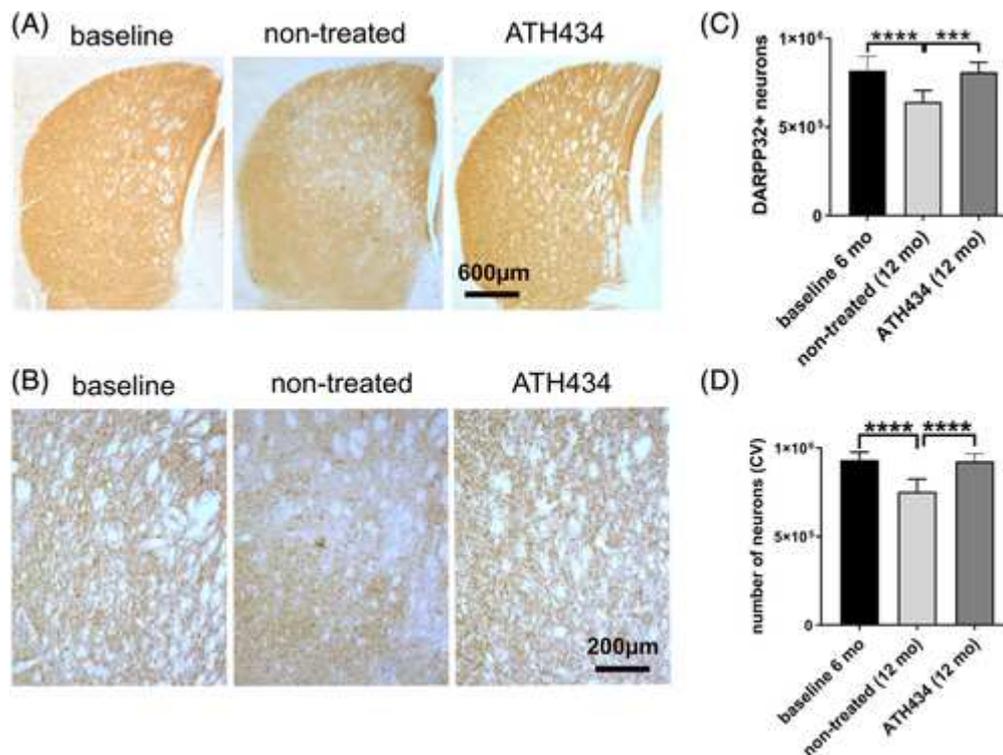


FIG. 1

[Open in figure viewerPowerPoint](#)

ATH434 preserves motor performance and shows a neuroprotective effect in SNc in PLP- $\alpha$ -syn mice. (A) Slips per step quantified in the challenging beam test in 6, 8, 10 and 12 months old ATH434-treated (ATH434; red squares) and non-treated mice (black dots).  $N = 6-12$ . Error bars indicate SD. Repeated measures design, mixed-effects model, Sidak's multiple comparisons test.  $*P < 0.05$ . (B) Performance in the pole test at baseline (6 months old; black bars), and 12 months old non-treated (light grey bars) and ATH434-treated mice (dark grey bars) measured by the T-turn time (left panel) and the T-total time (right panel).  $****P < 0.0001$ . (C) Representative images of SN sections stained against TH. Scale bar, 300  $\mu$ m. (D) Stereological counting of the total number of dopaminergic (TH+) neurons in the entire SNc in the different groups.  $N = 4-8$ . (E) Stereological counting of the total number of neurons with cresyl-violet (CV) staining in the entire SNc in the different groups.  $N = 4-6$ . Error bars indicate SD. Analysis of variance (ANOVA):  $****P < 0.0001$ ,  $***P < 0.001$ ,  $**P < 0.01$  (Tukey's test). (F) Correlation analysis between the number of TH+ [black diamonds (baseline), circles (non-treated), triangles (ATH434-treated)] and CV (white diamonds (baseline), circles (non-treated), triangles (ATH434-treated)) neurons in the SNc and number of slips per step. Simple linear regression analysis. TH+ neurons versus slips per step:  $R^2 = 0.21$ ,  $P = 0.0463$ ; CV neurons versus slips per step:  $R^2 = 0.39$ ,  $P = 0.0101$ . [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

ATH434 also prevented the loss of medium spiny neurons (MSNs) in the STR (Fig. 2). Stereological counting of DARPP32+ MSNs showed similar numbers in ATH434-treated and baseline PLP- $\alpha$ -syn mice, while non-treated animals suffered a significant reduction in the number of MSNs over the six-month experimental period (Fig. 2A-C). The neuronal protection in STR was confirmed by CV staining (Fig. 2D).



**FIG. 2**

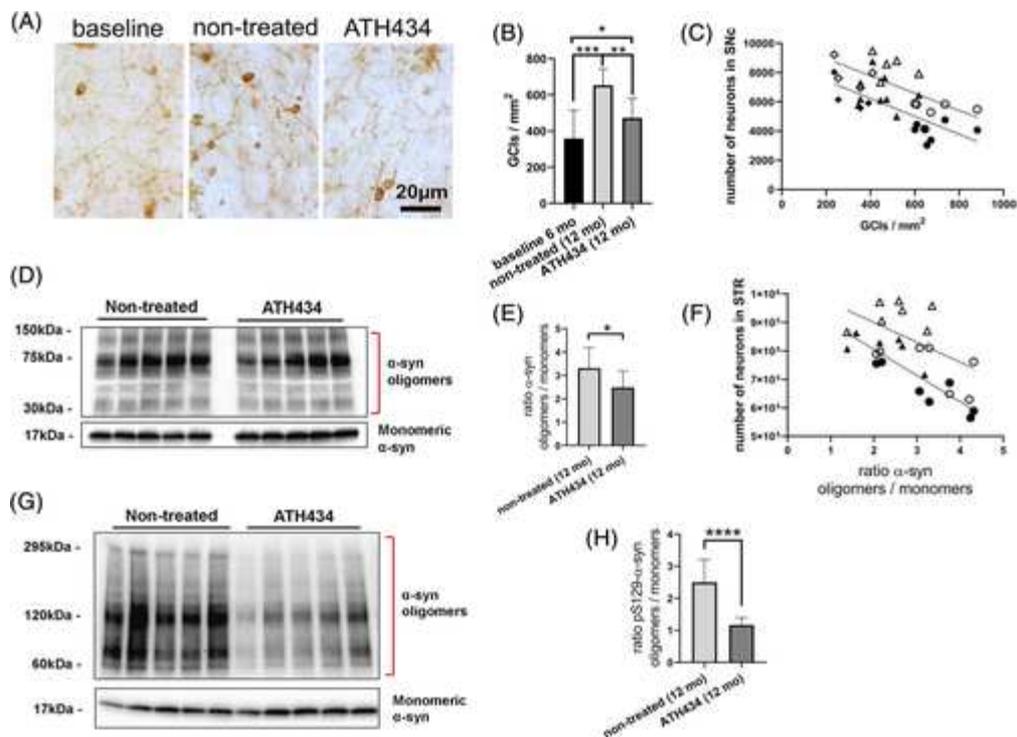
[Open in figure viewerPowerPoint](#)

ATH434 prevents neurodegeneration in the STR of PLP- $\alpha$ -syn mice. (A) Representative images of striatum (STR) sections stained against DARPP32. Scale bar, 600  $\mu$ m. (B) Striatum sections at higher magnification. Scale bar, 200  $\mu$ m. (C) Number of DARPP32+ neurons in the entire STR of the different groups.  $N = 7-10$ . (D) CV neurons in the entire STR of the different groups.  $N = 8-11$ . Error bars

indicate SD. Analysis of variance (ANOVA): \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Tukey's test). [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

## 2.2 ATH434 Reduces $\alpha$ -Syn Aggregation in PLP- $\alpha$ -Syn Mice

Previous findings demonstrated the ability of ATH434 to modulate  $\alpha$ -syn aggregation *in vitro* and *in vivo*<sup>11</sup>; therefore, we assessed its potential to reduce  $\alpha$ -syn accumulation in MSA mice. Immunohistological analysis showed a significant reduction of GCI-like inclusions in the SNc of ATH434-treated mice compared to non-treated animals, with levels similar to the baseline group (Fig. 3A,B). Moreover, the decrease of  $\alpha$ -syn aggregates significantly correlated with the neuroprotective effect observed in the SNc (TH+ neurons vs. GCI density:  $R^2 = 0.47$ ,  $P = 0.0012$ ; CV neurons vs. GCI density:  $R^2 = 0.46$ ,  $P = 0.004$ ) (Fig. 3C).



**FIG. 3**

[Open in figure viewerPowerPoint](#)

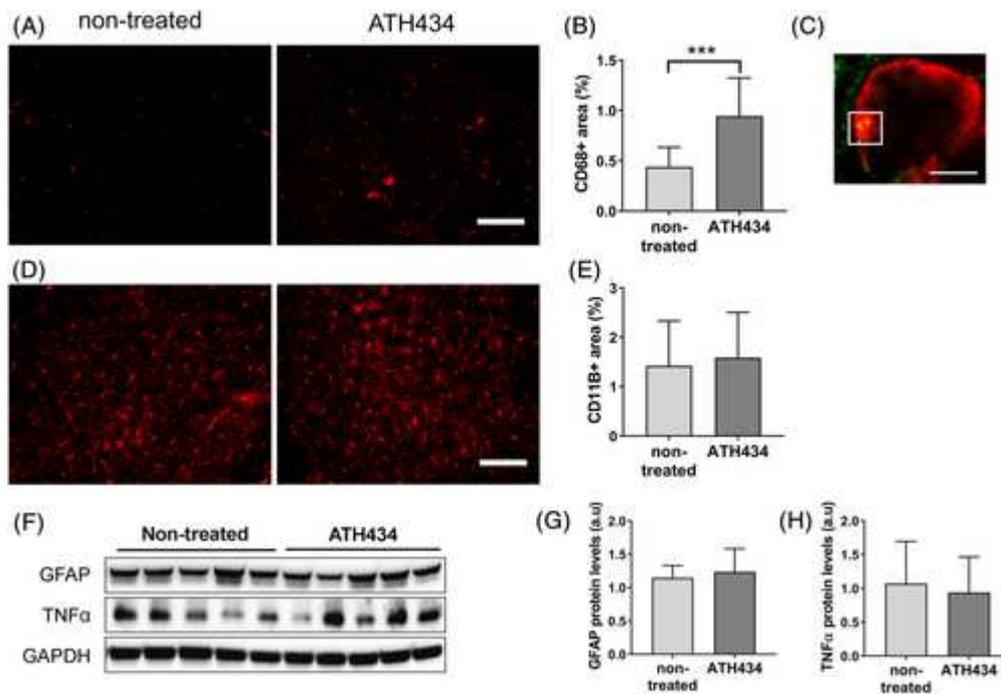
ATH434 reduces  $\alpha$ -syn aggregation. (A) Representative images of SN sections stained for pS129  $\alpha$ -syn to identify GCI-like aggregates. Scale bar, 20  $\mu$ m. (B) GCI density in SN expressed in GCIs/mm<sup>2</sup>. N = 12–14. Error bars indicate SD. Analysis of variance (ANOVA): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Tukey's test). (C) Correlation analysis between the number of TH+ [black diamonds (baseline), circles (non-treated), triangles (ATH434-treated)] or CV [white diamonds (baseline), circles (non-treated), triangles (ATH434-treated)] neurons and GCI density in the SNc. Simple linear regression analysis. TH+ neurons versus GCI density:  $R^2 = 0.47$ ,  $P = 0.0012$ ; CV neurons versus GCI density,  $R^2 = 0.46$ ,  $P = 0.004$ . (D) Representative blots showing levels of  $\alpha$ -syn monomers (lower panel; short exposure time) and  $\alpha$ -syn oligomeric species (upper panel; long exposure time) in midbrains of non-treated and ATH434-treated mice. Individual lanes represent brain homogenates of individual mice. (E) Quantification of the ratio of  $\alpha$ -syn oligomers versus monomeric species. N = 9. Error bars indicate SD. Unpaired *t* test, \* $P < 0.05$ . (F) Correlation analysis of oligomer/monomer  $\alpha$ -syn ratio and striatal neurons. Simple linear regression. DARPP32+ neurons in STR versus  $\alpha$ -syn oligomers/monomers ratio [black circles (non-treated) and triangles (ATH434-treated)]:  $R^2 = 0.75$ ,  $P = 0.0001$ ; CV neurons in STR versus  $\alpha$ -syn oligomers/monomers ratio [white circles (non-treated) and triangles (ATH434-treated)]:  $R^2 = 0.30$ ,

$P = 0.0426$ . (G) Representative blots showing levels of phosphorylated  $\alpha$ -syn at Ser129 (pS129): monomers (lower panel; short exposure time) and oligomeric species (upper panel; long exposure time) in midbrains of non-treated and ATH434-treated mice. Individual lanes represent brain homogenates of individual mice. (H) Quantification of the ratio of pS129- $\alpha$ -syn oligomers versus monomeric species.  $N = 9$ . Error bars indicate SD. Unpaired  $t$  test, \*\*\*\* $P < 0.0001$ . [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

In addition to the effect on the number of inclusions, western blot analysis showed a significant reduction in the ratio of total and phosphorylated  $\alpha$ -syn oligomers versus monomer in ATH434-treated mice compared to the non-treated group (Fig. 3D–H). Thus, the results confirmed the modulatory effect of ATH434 on  $\alpha$ -syn oligomerization, with a shift from oligomeric to monomeric  $\alpha$ -syn in treated animals. Interestingly, lower levels of total  $\alpha$ -syn oligomeric species significantly correlated with the rescue of striatal neurons (DARPP32+ neurons in STR vs.  $\alpha$ -syn oligomers/monomers ratio:  $R^2 = 0.75$ ,  $P = 0.0001$ ; CV neurons in STR vs.  $\alpha$ -syn oligomers/monomers ratio:  $R^2 = 0.30$ ,  $P = 0.0426$ ) (Fig. 3E).

### 2.3 ATH434-Treated Mice Show Increase of Microglial Phagocytic Activation that Is Not Associated with Neuroinflammation

To assess the effect of ATH434 treatment on microglial activation, we performed immunofluorescence microscopy for CD68 in SN brain sections, a lysosomal marker indicative of phagocytic activity of microglia.<sup>26</sup> ATH434-treated PLP- $\alpha$ -syn mice showed a significant increase in CD68 levels in the SN compared to non-treated animals (Fig. 4A,B). In addition, confocal microscopy demonstrated the presence of  $\alpha$ -syn within CD68+ lysosomes in microglia (Fig. 4C). The increase in CD68 levels was not associated with an increase of the microglial marker CD11b (Fig. 4D,E), astrogliosis (Fig. 4F,G) or the pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$  (Fig. 4F,H). Moreover, there was a significant correlation between the increase of microglial lysosomal marker CD68 and the reduction in the intracellular GCI-like aggregates ( $R^2 = 0.27$ ,  $P = 0.0066$ ), the lower levels of oligomeric species ( $R^2 = 0.25$ ,  $P = 0.0363$ ), the preservation of MSNs in the STR (DARPP32+ neurons:  $R^2 = 0.31$ ,  $P = 0.0239$ ; CV neurons:  $R^2 = 0.28$ ,  $P = 0.0345$ ) and the motor improvement ( $R^2 = 0.28$ ,  $P = 0.0137$ ). Finally, there was a positive, but not significant, correlation between CD68 levels and the neuroprotective effect of ATH434 in the SNc (TH+ neurons:  $R^2 = 0.21$ ,  $P = 0.0832$ ; CV neurons in SNc:  $R^2 = 0.24$ ,  $P = 0.1023$ ) (Figure S1A–G).



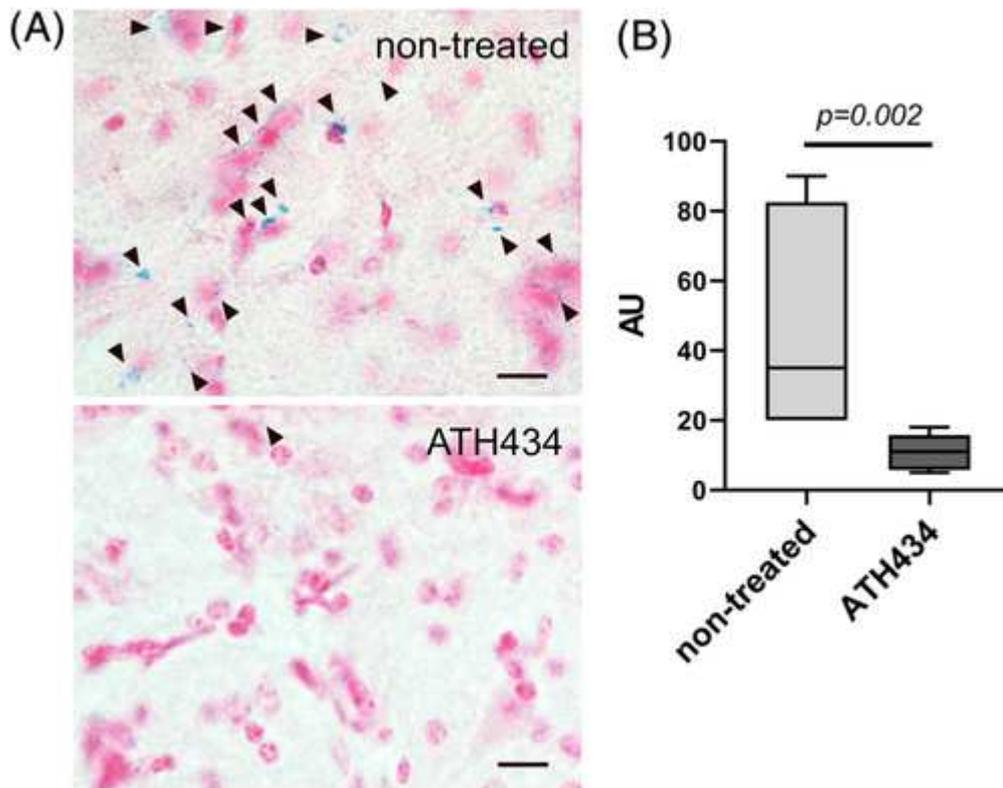
**FIG. 4**

[Open in figure viewerPowerPoint](#)

ATH434-treated mice show increase of microglial phagocytic activation. **(A)** Representative immunofluorescence images of SN sections stained against CD68. Scale bar, 150  $\mu$ m. **(B)** CD68 positive (CD68+) area in the different groups expressed as the % of the total area of the SN. N = 12–14. Error bars indicate SD. Unpaired *t* test, \*\*\**P* < 0.001. **(C)** Representative confocal microscopy of the co-localization of  $\alpha$ -syn (green) and CD68 (red) in microglial lysosomes (dot-like structures within the white box). Scale bar, 5  $\mu$ m. **(D)** Representative immunofluorescence images of SN sections stained against CD11b. Scale bar, 150  $\mu$ m. **(E)** CD11b positive (CD11b+) area in the different groups expressed as the % of the total area of the SN. N = 12–14. Error bars indicate SD. **(F)** Representative blots showing levels of GFAP, TNF $\alpha$  and GAPDH in midbrains of non-treated and ATH434-treated mice. GAPDH was used as loading control. Individual lanes represent brain homogenates of individual mice. **(G,H)** Quantification of GFAP and TNF $\alpha$  protein levels in midbrains of non-treated and ATH434-treated mice. The data is shown in arbitrary units (a.u.). N = 9–10. Error bars indicate SD. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](#)]

## 2.4 ATH434 Reduces the Level of Ferric Iron (Fe<sup>3+</sup>) in the SNc of PLP- $\alpha$ -Syn Mice

To assess the Fe<sup>3+</sup> in the SNc of PLP- $\alpha$ -syn mice, we applied a classical Perls Prussian stain and estimated the distribution of the resulting blue precipitates in non-treated versus ATH434-treated MSA mice. In SNc of PLP- $\alpha$ -syn mice at 12 months of age, intracellular Fe<sup>3+</sup> (Fig. 5A) was significantly reduced after the treatment with ATH434, a known moderate affinity iron chelator.<sup>11</sup>



**FIG. 5**

[Open in figure viewerPowerPoint](#)

ATH434 treatment decreases the levels of ferric iron in the brain of PLP- $\alpha$ -syn mice. (A) Perls Prussian blue staining to detect cellular  $\text{Fe}^{3+}$ ; blue precipitates (arrows) are scattered in the SNc of non-treated PLP- $\alpha$ -syn mice, but are rarely identified in ATH434-treated animals. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ . (B) Box and whiskers plot with Mann–Whitney test to compare the estimated level of blue precipitates in non-treated and ATH434-treated mice. N = 6. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

### 3 Discussion

Although the origin and exact role of fibrillary  $\alpha$ -syn inclusions and soluble oligomeric species in MSA are still under discussion, several *in vivo* and *in vitro* studies have shown the ability of pathological  $\alpha$ -syn to spread through the CNS, to induce cellular dysfunction, neuroinflammation, motor symptoms and neurodegeneration.<sup>27–39</sup> Based on this evidence and the results from preclinical studies, numerous ongoing clinical trials are focused on targeting or modulating  $\alpha$ -syn oligomerization and aggregation.<sup>6</sup> In particular, the use of small molecules that modulate  $\alpha$ -syn accumulation presents many advantages such as their high oral bioavailability, blood–brain barrier penetration, ability to act inside cells,<sup>40</sup> and promising therapeutic potential in preclinical models of  $\alpha$ -synucleinopathies by reducing  $\alpha$ -syn inclusions, neurodegeneration and improving motor function.<sup>7–13</sup>

We show that the small molecule ATH434, a novel quinazolinone inhibitor of iron-mediated  $\alpha$ -syn protein accumulation,<sup>11</sup> reduces GCI-like inclusions and  $\alpha$ -syn oligomeric species in MSA mice. We also show that ATH434 has a neuroprotective effect in the STR and the SNc of PLP- $\alpha$ -syn mice, preventing the loss of medium spiny and dopaminergic neurons respectively in these brain regions. In this regard, there was a significant correlation between the reduction of GCI-like inclusions in the SNc, the dopaminergic neuroprotective effect in the SNc and the motor improvement. Therefore, our findings suggest that the neuroprotective effect of ATH434 in this brain region and on the motor function is associated with its modulatory effect on  $\alpha$ -syn aggregation. We also identified a shift from oligomeric

towards monomeric  $\alpha$ -syn species in ATH434-treated mice with a significant lowering of the pathological phosphorylated high-molecular weight forms. These findings, together with the observed lower density of GCIs in the treated animals, suggest that the ATH434 effect is linked to preventing the formation of new  $\alpha$ -syn aggregates during the progression of the disease rather than disaggregation of already existing aggregates at the beginning of the therapy. Interestingly, there was a significant correlation between the reduction in  $\alpha$ -syn oligomers and the neuroprotective effect of ATH434 in the STR, suggesting that soluble  $\alpha$ -syn pathogenic species may contribute to the MSN degeneration in MSA mice. Our data corroborate observations from a previous study, where ATH434 reduced  $\alpha$ -syn aggregation *in vitro* and *in vivo*.<sup>11</sup> In this earlier work, administration of ATH434 in toxin-based and transgenic mouse models of PD prevented the loss of dopaminergic neurons in SNc and ameliorated motor symptoms. These effects were associated with a decrease in oxidative stress, SNc iron and a reduction of  $\alpha$ -syn pathological species.<sup>11</sup> Altogether, these findings indicate that ATH434 is able to modulate  $\alpha$ -syn accumulation in different pathological conditions, leading to neuroprotection and motor improvement.

PLP- $\alpha$ -syn mice recapitulate the natural history of the human MSA-P, developing SND and neuroinflammation with aging, among other disturbances.<sup>22</sup> At early stages —2 months old— these animals show GCI-like inclusions in the brain without signs of neuroinflammation, neurodegeneration or motor symptoms. However, with aging, MSA mice develop progressive neurodegeneration in motor areas that becomes evident at 4–6 months of age in SNc and at 12 months of age in STR, accompanied by  $\alpha$ -syn oligomer formation, progressive neuroinflammation and motor dysfunction.<sup>20, 22</sup> Considering that MSA patients are usually diagnosed once the motor symptoms have appeared and the neurodegenerative process has started<sup>41</sup> we decided to administer ATH434 to MSA mice at 6 months of age, when initial motor symptoms are already present,<sup>22</sup> and to evaluate its therapeutic potential on the disease progression up to 12 months of age. The fact that ATH434 was able to halt SND and preserve motor function at this stage of the disease in MSA mice constitutes a promising rationale for future clinical trials in MSA.

Here we also show that ATH434-treated mice presented an increase of the microglial lysosomal marker CD68. This prompted us to characterize further the neuroinflammatory status of the animals receiving ATH434. Molecular and histological evaluation demonstrated that the increase of CD68 immunoreactivity observed in ATH434-treated mice was not associated with further increase of astrogliosis, microgliosis or proinflammatory markers. In contrast, we observed a positive correlation between CD68 levels in SN and the neuroprotective effect of ATH434, and a negative correlation between CD68 and  $\alpha$ -syn inclusions and oligomers (Figure S1). Furthermore, we demonstrated the presence of pathological  $\alpha$ -syn within CD68+ lysosomes of microglia. Thus the results support an increase of microglial phagocytic activity linked at least partly to the clearance of  $\alpha$ -syn through the lysosomal pathway<sup>4, 42-44</sup> without further increase of the toxic proinflammatory signaling in the brains of MSA mice receiving ATH434 therapy.

Iron accumulation constitutes another pathological feature of MSA. Several studies have demonstrated increased levels of iron in brain areas affected by the disease.<sup>45</sup> Increased iron in the SN is also a feature of preclinical PD models.<sup>11, 46</sup> In addition, preclinical studies have shown that, either by direct interaction or indirectly (ie, through the generation of oxidative stress), iron is able to induce  $\alpha$ -syn aggregation.<sup>47-52</sup> Here we show that ferric iron in the SNc of PLP- $\alpha$ -syn mice is lowered by ATH434 treatment, similar to previous observations in a murine PD model in which ATH434 reduced MPTP-induced elevations of iron.<sup>11</sup> Taken together, these new results provide the first evidence for the possible involvement of iron in the neurodegeneration process in the PLP- $\alpha$ -syn mouse model. Further studies however will be needed to characterize the stages of iron involvement during the progression of

the disease. Our findings corroborate the neuroprotective effects of ATH434 in  $\alpha$ -synucleinopathy, which may be attributed to its iron chelator activity as well as its effect on limiting  $\alpha$ -syn aggregation.

In summary, our study confirms the neuroprotective potential of ATH434 previously observed in PD models<sup>11</sup> and indicates that oral administration of ATH434, which recently completed a phase I trial in healthy volunteers,<sup>53</sup> could constitute a promising therapeutic strategy to slow down disease progression in MSA, supporting further development in human clinical trials with patients suffering from MSA or related  $\alpha$ -synucleinopathies.

## **Acknowledgments**

The study was supported by research grant of Alterity Therapeutics and grants of the Austrian Science Fund (FWF) F4414 and W1206-08. The authors are grateful to Martina Wick for the excellent technical assistance.

## **Author Roles**

A.H.G.: acquisition, analysis, and interpretation of data; drafting and revising the manuscript. V.R., C.S., K.M.: acquisition, analysis, and interpretation of data. G.K.W.: revising the manuscript. M.B., D.S. and N.S.: conception and design, analysis and interpretation of data, revising the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.