Pathologie moléculaire de l'α-synucléine : relations potentielles avec les maladies à prion

Anne-Laure Boyer Boyer-Mougenot

▶ **To cite this version:**

Anne-Laure Boyer Boyer-Mougenot. Pathologie moléculaire de l'α-synucléine : relations potentielles avec les maladies à prion. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10057 . tel-00864013

HAL Id: tel-00864013

https://theses.hal.science/tel-00864013

Submitted on 20 Sep 2013

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

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

N° d'ordre : 57-2011 Année 2011

THESE

Présentée devant
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE E2M2

Pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 13 avril 2011
par
Anne-Laure BOYER MOUGENOT

Pathologie moléculaire de l'α-synucléine : Relations potentielles avec les maladies à prion

Directeur de thèse : M. le Dr Thierry BARON

JURY : M. le Pr Jérôme HONNORAT, Président
Mme le Dr Sophie MOUILLET RICHARD, Rapporteur
Mme le Dr Véronique PERRIER, Rapporteur
M. le Pr Sylvain LEHMANN, Examinateur
M. le Dr Stéphane HAIK, Examinateur
M. le Dr Armand PERRET LIAUDET, Examinateur
M. le Dr Stéphane LEGASTELOIS, Co-encadrant
M. le Dr Thierry BARON, Directeur de thèse

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jérôme Honnorat,

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de présider le Jury de cette thèse et vous prie de croire au profond respect et à l'estime que je vous porte.

A Madame le Docteur Sophie Mouillet-Richard,

C'est avec gratitude que je vous remercie d'avoir bien voulu être rapporteur de ma thèse. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Véronique Perrier,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et vous prie de croire en mes sincères et respectueux remerciements.

A Monsieur le Docteur Armand Perret-Liaudet,

C'est avec beaucoup de sincérité que je vous remercie de votre présence dans ce jury ainsi que des échanges, toujours constructeurs et sympathiques, que nous avons eu au cours de ma thèse.

A Monsieur le Professeur Sylvain Lehmann,

Pour avoir si volontiers accepté d'examiner notre travail et pour votre accueil, ainsi que celui de votre équipe, à Montpellier.

A Monsieur le Docteur Stéphane Haïk,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'examiner cette thèse et vous adresse mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Thierry Baron,

Ces quelques lignes sont bien trop courtes pour exprimer le respect que je te porte. Merci pour ton soutien infaillible, ta justesse et ton ouverture d'esprit. Ces quatre années de thèse m'ont énormément appris, tant d'un point de vue scientifique que personnel.

A Monsieur le Docteur Stéphane Legastelois,

Pour qui j'ai une infinie estime et à qui je dois une partie de ce que je suis devenue. Je te remercie du fond du cœur pour ta confiance…

Ce travail a été réalisé dans le cadre des Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE). Je remercie par conséquent vivement Indicia Biotechnology ainsi que l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie pour avoir subventionné ma thèse. Un grand merci également à Didier Calavas et à l'ensemble du laboratoire de l'anses Lyon pour m'avoir fait bénéficier de son expertise et de ses infrastructures.

A Vincent, à Victor & à notre petit bébé qui arrive

A ma sœur Marine et à Gaétan

A mes très chers parents

A mes grands-parents et à toute ma famille

A Elo, Nico, Mathieu

A Aurélie et Florent (*God save the Manchon!*)

A tous mes amis et à leurs enfants :

Emilie, Aurélien, Elisa, Thomas, Pierre, Blandine, Noé, Gautier, Jasmine, Esmée, Franck, Sophie, Loucas, Maya, Béné, Antoine, Anaël, Adrien, Inès, Julien, Rémi, Julie, Philip, Maëlle, William, Mathias, Nelly, Fred, Lou-ann, Milo, Damien, Olivia, Dorian, Jean, Hélène, Timéo, Aline, Mathieu, Alexis, Delphine, Catherine, Jean-Michel, Quentin, Sabine, Serge, Angelina, Anthony, Jenny, Carlos, Théa, Sasha, Raymond

Aux radiologues d'Imadis *(You did it guys !)* et à leur famille

A toute la dream team d'Indicia Biotechnology :

Béné, Anne, Sab, Caro, Cendre, Emilie, Elo, Guillaume, Arnaud, Christophe, Amandine, Marjo, Gaëlle, Mélanie, JC, Hélène, Xav et Marie-Pierre *(qui m'a tout appris !)*

A l'ensemble du personnel de l'anses Lyon et particulièrement à toute l'équipe de l'unité ATNC pour son accueil et son soutien :

Dodo *(merci pour tes conseils si précieux)*, Simon et Johann *(mes Brothers in Thesis)*, Jérémy *(je te passe le bébé !)*, Capitaine Mikaël, Domi, Céline, Jean-Noël *(effectivement, j'ai souffert !)*, Michaël, Kevin, Anna, Jean-Michel, Claire, Mireille, Laila, Anne-Gaëlle, Eric, Véro, Vérane, Latifa, Christian, Brahim, Pauline, Béné, Pierre et Corinne

« A ship in harbour is safe, but that is not what ships are built for. »

William Shedd

Sommaire

Remerciements 2

Sommaire 6

Publications présentées 10

Abréviations 13

Contexte et objectifs du travail de thèse 18

Rappels bibliographiques 21

Introduction 22

I. Généralités sur l'α-synucléine 23

I-1 L'α-synucléine, protéine présynaptique 24

a) Du gène à la protéine 24
b) Plasticité conformationnelle 26
c) Localisation 27
d) Fonctions physiologiques 27

I-2 L'α-synucléine & neurotoxicité 29

a) Les formes pathologiques de l'α-synucléine 30
b) Facteurs influençant l'oligomérisation de l'α-synucléine 32
c) Les corps d'inclusions 35
d) Mécanismes neurotoxiques 36

II. Les principales synucléinopathies et leur modélisation expérimentale 39

II-1 Les principales synucléinopathies 39

a) La maladie de Parkinson 39
b) La démence à corps de Lewy 44
c) L'atrophie multi-systématisée 45

II-2 Modèles *in vitro* et *in vivo* d'altérations de l'α-synucléine 47
a) Les modèles d'intoxication 48
b) Les modèles génétiques 54

III. Les maladies à prion – Liens éventuels avec les pathologies de l'α-synucléine 63

III-1 Le prion et les ESST 63
a) Généralités sur la protéine prion 63
b) De la PrPc à la PrPd 66
c) Pathogénicité des protéines prion 68
d) Les différentes formes d'ESST 69
e) Caractérisation des maladies à prion 70

III-2 Implication concomitante du prion et de l'α-synucléine dans une même maladie neurodégénérative 73
a) Protéine prion et synucléinopathies 73
b) Altérations de l'α-synucléine et maladies à prion 74
c) Relations entre l'α-synucléine et la protéine prion 74
d) Implications diagnostiques des altérations protéiques 75

III-3 Caractère « prion-like » de l'α-synucléine 76
a) Propagation des altérations de l'α-synucléine dans le cerveau de patients parkinsoniens 77
b) Modèles animaux reproduisant expérimentalement la transmission des altérations de l'α-synucléine 79
c) Etudes *in vitro* de la transmission des altérations de l'α-synucléine 81
d) Similitudes des mécanismes moléculaires inhérents à la transmission des altérations de l'α-synucléine et de la protéine prion 82
e) Conséquences du caractère « prion-like » de l'α-synucléine 85

Résultats expérimentaux 87

I. Développement et caractérisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'α-synucléine humaine 90

II. Transmission de souches de prion à des souris transgéniques surexprimant l'α-synucléine humaine mutée en A53T 101

III. Transmission des altérations biochimiques de l'α-synucléine d'une souris à l'autre 112

Conclusion et perspectives 123

Références bibliographiques 138

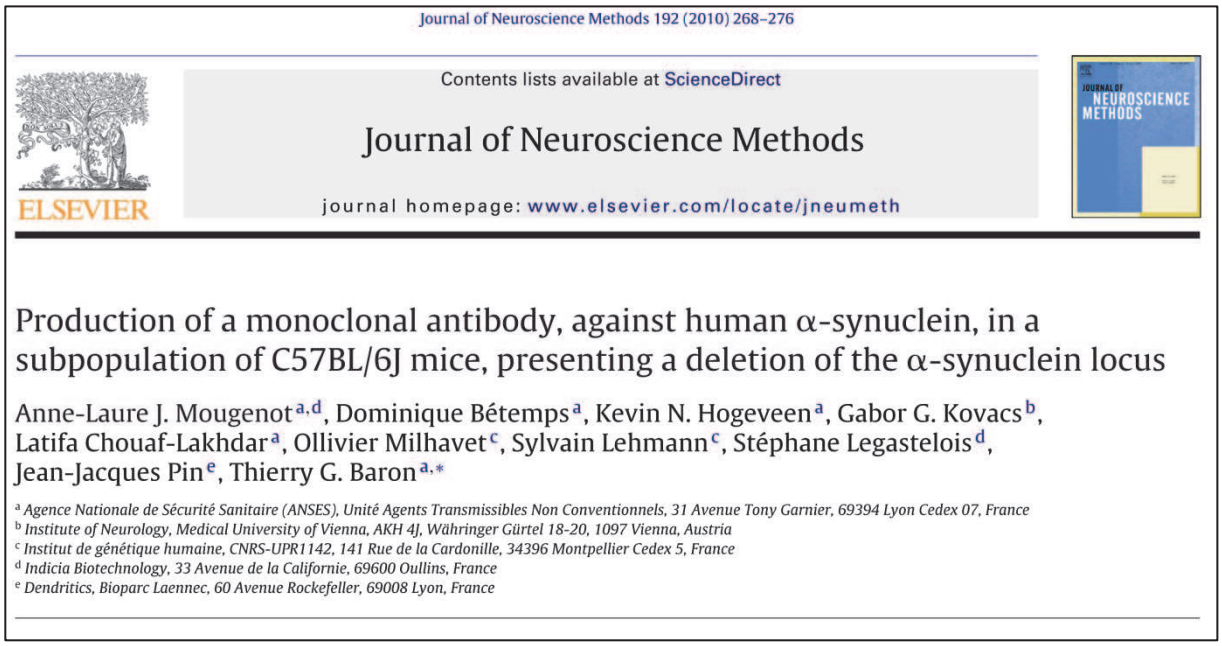
Publications présentées

Premier article

Production of a monoclonal antibody, against human α-synuclein, in a subpopulation of C57Bl/6J mice presenting a deletion of the α-synuclein locus

Anne-Laure J. Mougenot, Dominique Bétemps, Kevin N. Hogeveen, Gabor G. Kovacs, Latifa Chouaf-Lakhdar, Ollivier Milhavet, Sylvain Lehmann, Stéphane Legastelois, Jean-Jacques Pin, Thierry G. Baron

Journal of Neuroscience Methods 192 (2010) 268–276



Journal of Neuroscience Methods 192 (2010) 268–276

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneumeth

Production of a monoclonal antibody, against human α-synuclein, in a subpopulation of C57BL/6J mice, presenting a deletion of the α-synuclein locus

Anne-Laure J. Mougenot[a,d], Dominique Bétemps[a], Kevin N. Hogeveen[a], Gabor G. Kovacs[b], Latifa Chouaf-Lakhdar[a], Ollivier Milhavet[c], Sylvain Lehmann[c], Stéphane Legastelois[d], Jean-Jacques Pin[e], Thierry G. Baron[a,*]

[a] Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES), Unité Agents Transmissibles Non Conventionnels, 31 Avenue Tony Garnier, 69394 Lyon Cedex 07, France
[b] Institute of Neurology, Medical University of Vienna, AKH 4J, Währinger Gürtel 18-20, 1097 Vienna, Austria
[c] Institut de génétique humaine, CNRS-UPR1142, 141 Rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 5, France
[d] Indicia Biotechnology, 33 Avenue de la Californie, 69600 Oullins, France
[e] Dendritics, Bioparc Laennec, 60 Avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

Ce sujet a aussi fait l'objet d'un poster présenté à l'ICAD:

Characterization of a monoclonal antibody against human α-synuclein produced in a subpopulation of C57BL/6J OlaHsd mouse presenting a deletion of the α-synuclein gene

Anne-Laure J. Mougenot, Dominique Bétemps, Gabor G. Kovacs, Stéphane Legastelois, Jean-Jacques Pin, Thierry G. Baron

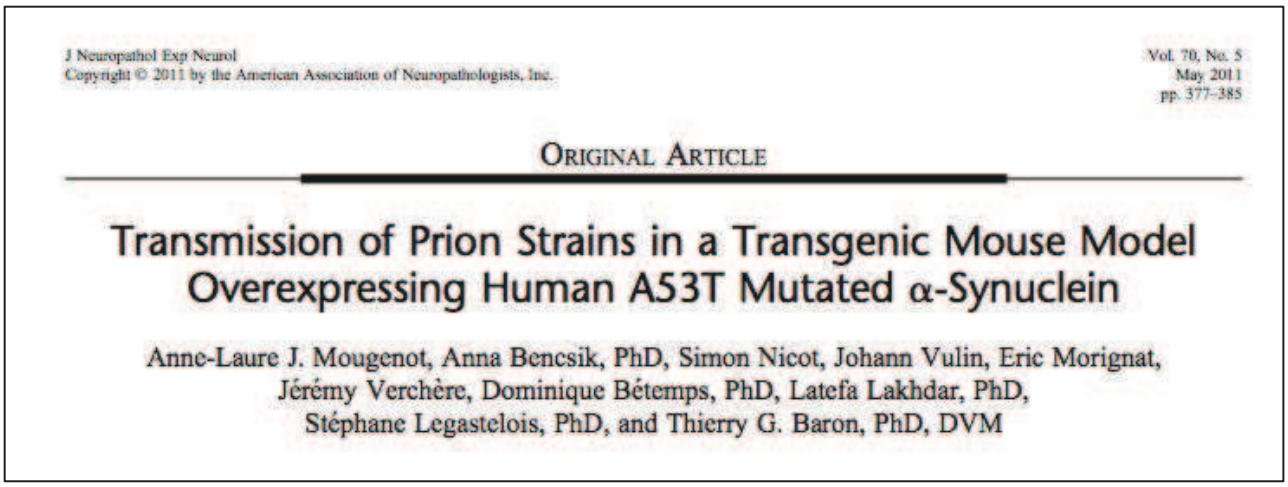
International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD). Vienne (Autriche) – Juillet 2009 - Congrès organisé par the *Alzheimer's Association*

Deuxième article

Transmission of prion strains in a transgenic mouse model overexpressing human A53T mutated α-synuclein

Anne-Laure J. Mougenot, Anna Bencsik, Simon Nicot, Johann Vulin, Eric Morignat, Jérémy Verchère, Dominique Bétemps, Latefa Lakhdar, Stéphane Legastelois, Thierry G. Baron

Journal of Neuropathology and Experimental Neurology Vol.70 No. 5 May 2011 pp 377-385



J Neuropathol Exp Neurol
Copyright © 2011 by the American Association of Neuropathologists, Inc.
Vol. 70, No. 5
May 2011
pp. 377–385

ORIGINAL ARTICLE

Transmission of Prion Strains in a Transgenic Mouse Model Overexpressing Human A53T Mutated α-Synuclein

Anne-Laure J. Mougenot, Anna Bencsik, PhD, Simon Nicot, Johann Vulin, Eric Morignat, Jérémy Verchère, Dominique Bétemps, PhD, Latefa Lakhdar, PhD, Stéphane Legastelois, PhD, and Thierry G. Baron, PhD, DVM

Troisième article

Prion-like mouse-to-mouse transmission of α-synuclein biochemical alterations

Anne-Laure J. Mougenot, Simon Nicot, Eric Morignat, Jérémy Verchère, Latefa Lakhar, Stéphane Legastelois, Thierry G. Baron

Article soumis à publication

Abréviations

α-syn	α-synucléine
Aβ	Peptide **A**myloïde **β**
AD	**A**utosomique **D**ominant
ADNc	**A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique **c**omplémentaire
AR	**A**utosomique **R**écessif
ARNm	**A**cide **R**ibo**N**ucléique **m**essager
AS11	Anticorps monoclonal anti α-synucléine
ATNC	**A**gent **T**ransmissible **N**on **C**onventionnel
ATP	**A**dénosine **T**ri**P**hosphate
ATPase	**A**dénosine **T**ri**P**hosphate synthét**ase**
BALB/c	Lignée murine sauvage fréquemment utilisée pour la production d'anticorps monoclonaux
C506M3	Souche de tremblante classique expérimentale adaptée à la souris
C57Bl/6J	Lignée murine sauvage exprimant l'α-synucléine murine endogène
C57Bl/6S	Sous-population de C57Bl/6J présentant une délétion spontanée du gène *snca*
CSP-α	**C**ystein **S**tring **P**rotein **α**
COMT	**C**athecol-**O**-**M**ethyl **T**ransferase
COS-7	Lignée cellulaire fréquemment utilisée dans le cadre de protocoles de transfection [cellules de rein de sing **C**V-1 à l'**O**rigine portant du matériel génétique issu du virus **S**V40]
ELISA	**E**nzyme **L**inked **I**mmuno **S**orbent **A**ssay
ESB	**E**ncéphalopathie **S**pongiforme **B**ovine
ESB-C	**E**ncéphalopathie **S**pongiforme **B**ovine **C**lassique
ESB-H	**E**ncéphalopathie **S**pongiforme **B**ovine de type **H**
ESB-L	**E**ncéphalopathie **S**pongiforme **B**ovine de type **L**
ESST	**E**ncéphalopathie **S**pongiforme **S**ubaiguë **T**ransmissible
GCI	**G**lial **C**ytoplasmic **I**nclusion – Inclusion gliale cytoplasmique
GPI	**G**lycosyl **P**hosphatidyl **I**nositol
HEK 293	**H**uman **E**mbryonic **K**idney **293**

6-OHDA	6-hydroxydopamine
DA	**D**op**A**mine
hPDGF-β	**h**uman **P**latelet **D**erived **G**rowth **F**actor **β**
IC	**I**ntra-**C**érébrale
IF	**I**mmuno**F**luorescence
Ig	**I**mmuno**g**lobuline
IHC	**I**mmuno **H**isto **C**himie
IP	**I**ntra-**P**éritonéale
kDa	**K**ilo **Da**lton
L-DOPA	**L**-**D**ihydr**O**xy**P**henyl**A**lanine ou Lévodopa
LB	**L**ewy **B**ody – Corps de Lewy
LRRK2	**L**eucine **R**ich **R**epeat **K**inase **2**
MALDI-TOF	**M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onisation **T**ime **O**f **F**light mass spectrometry
MAOB	**M**ono**A**min**O**xydase **B**
ME7	Souche de tremblante classique expérimentale adaptée à la souris
MPTP	1-**M**ethyl-4-**P**henyl-1, 2, 3, 6-**T**etrahydroxy**P**yridine
MPP+	1-**M**ethyl-4**P**henl**P**yridinum
NAC	**N**on-**A**myloid **C**omponent
NADH	Forme **h**ydrogénée du **N**icotinamide **A**dénine **D**inucléotide
Nor98	Tremblante atypique
NSC	**N**eural **S**tem **C**ell
NSF	**N**-ethylmaleimide **S**ensitive **F**usion protein
PINK1	**P**TEN-**IN**duced **K**inase **1**
PK	**P**rotéinase **K**
Prion	**Pro**teinaceous **in**fectious particle
prnp	Gène de la protéine prion
PrPc	Protéine Prion cellulaire

PrPCtm	Protéine prion cellulaire transmembranaire fixée à la membrane par une ancre GPI ayant conservé son peptide signal N-terminal
PrPd	disease-associated Prion Protein – Protéine prion pathologique
PrPNtm	Protéine prion cellulaire transmembranaire non glypiée et non glycolsylée, présentant une orientation inverse par rapport à la PrPCtm
PrPres	Fraction résistante à la protéinase K de la protéine prion
PrPsec	Protéine prion sécrétoire
PSer129	**P**hosphorylation sur la **sér**ine **129** de l'α-synucléine
PTEN	**P**hosphatase and **TEN**sin
rAAV	**r**ecombinant **A**deno-**A**ssociated **V**irus – Adénovirus recombinant
rLV	**r**ecombinant **L**enti**V**irus – Lentivirus recombinant
scFV	**s**ingle **c**hain **V**ariable **F**ragment
SDS	**S**odium **D**odecyl **S**ulfate – Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	**S**odium **D**odecyl **S**ulfate **P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis
SH-SY5Y	Neuroblastome humain
SK-N-MC	Neuroblastome humain
SN	**S**ubstance **N**oire
SNARE	**S**oluble **N**SF **A**ttachment protein **RE**ceptor
snca	Gène de l'α-synucléine
TEP	**T**omographie à **E**mission de **P**ositons
Tg	**T**rans**g**énique
TgD9	Lignée murine transgénique surexprimant l'α-synucléine humaine sauvage
TgM83	Lignée murine transgénique surexprimant l'α-synucléine humaine mutée en A53T
TH	**T**yrosine **H**ydroxylase
Thy1	**Thy**mocyte antigen **1**
Ubi	**Ubi**quitine
UHCL1	**U**biquitin **H**ydrolase **C**arboxy terminal **L1**
VH	Partie variable des chaînes lourdes des immunoglobulines

VL	Partie variable des chaînes légères des immunoglobulines
Wb	**W**estern-**b**lot
WT	**W**ild-**T**ype – Forme sauvage d'un gène ou d'une protéine

Contexte et objectifs

du travail de thèse

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies qui affectent de façon progressive et souvent irréversible le système nerveux central ou périphérique : elles sont causées par la détérioration du fonctionnement, voire par la perte, de cellules nerveuses. Elles peuvent être définies par les signes cliniques qui leur sont associés, par les régions cérébrales et les types cellulaires atteints, par leur étiologie si celle-ci est connue et enfin par les protéines impliquées dans leur pathogénicité (Kovacs *et al.* 2010a). En effet, la plupart de ces maladies sont liées à l'accumulation pathologique, dans le tissu nerveux, de protéines mal-conformées. Cette observation mène d'ailleurs à parler de « protéinopathies neurodégénératives ».

Ainsi, de façon usuelle, les altérations du peptide A-β et de la protéine tau sont associées à la maladie d'Alzheimer, celles de l'α-synucleine à la maladie de Parkinson et celles du prion aux encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles dont fait partie la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Mais ces associations simplistes ne reflètent pas la réalité complexe des maladies neurodégénératives puisque la présence simultanée de plusieurs protéines est communément observée au sein d'une même pathologie : par exemple, des dépôts d'α-synucléine, de protéine tau et de peptide A-β peuvent être mis en évidence de façon concomitante à ceux de protéines prion pathologiques (nommés PrPd pour « disease-associated prion protein ») dans des cerveaux de patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Haik *et al.* 2002; Vital *et al.* 2007; Kovacs *et al.* 2010b).

De plus, ces protéines possèdent de nombreuses similitudes de par leur structure : elles sont majoritairement intrinsèquement désordonnées et par conséquent instables et très enclines à adopter des conformations mal repliées. Les défauts de repliements (misfolding) de ces protéines neuronales engendrent la formation d'agrégats insolubles, couplée à une perte de leurs fonctions physiologiques, et à un gain de toxicité responsables du dysfonctionnement puis de la mort des cellules neurales (Kovacs *et al.* 2010a). Ces similitudes inspirent un nombre croissant d'études qui suggèrent que ces altérations protéiques seraient capables de se transmettre d'une cellule à l'autre, *via* des mécanismes pathogéniques qualifiés de « prion-like », puisqu'ils semblent être proches de ceux responsables de la propagation de la PrPd au cours des maladies à prion (Soto *et al.* 2008; Aguzzi 2009; Angot *et al.* 2009; Olanow *et al.* 2009c; Angot *et al.* 2010; Frost *et al.* 2010; Lee *et al.* 2010b).

Au sein des protéinopathies neurodégénératives, mon travail de thèse a consisté à étudier en particulier les relations pouvant exister entre les altérations moléculaires de l'α-synucléine et les maladies à prion.

Après une première étape méthodologique dédiée à la production d'anticorps monoclonaux anti α-synucléine, nous avons développé deux axes expérimentaux visant : (i) à analyser les

conséquences de la présence conjointe des formes pathologiques de la protéine prion et de l'α-synucléine au sein d'une même maladie neurodégénérative ; (ii) à étudier *in vivo* le caractère éventuellement transmissible des altérations de l'α-synucléine.

Afin d'introduire les résultats liés à ces travaux doctoraux, présentés sous forme de trois articles scientifiques, ce manuscrit débute par des *Rappels Bibliographiques*. Ceux-ci ont d'abord pour objet d'introduire les caractéristiques inhérentes à l'α-synucléine et à sa neurotoxicité. Cette bibliographie se poursuit ensuite par une présentation générale des principales synucléinopathies et des différents modèles expérimentaux permettant de reproduire certains aspects de ces maladies. Dans une dernière partie, après avoir défini ce que sont les encéphalopathies spongiformes subaiguës, nous décrivons dans quels cas ont pu être constatées des altérations concomitantes du prion et de l'α-synucleine ; puis, nous présentons les observations soutenant l'hypothèse portant sur le caractère « prion-like » de l'α-synucléine.

Rappels bibliographiques

Introduction

L'α-synucléine est une protéine neuronale de 140 acides aminés. Majoritairement présente sous forme soluble dans le cytoplasme des terminaisons nerveuses présynaptiques (Weinreb *et al.* 1996; Kahle *et al.* 2000), elle peut aussi adopter une conformation secondaire en hélice α et se lier aux membranes, en particulier celles des vésicules, régulant ainsi la libération de neurotransmetteurs dans les jonctions synaptiques (Withers *et al.* 1997). Si son rôle physiologique précis reste mal connu, l'α-synucléine est surtout étudiée pour son implication dans un groupe de maladies neurodégénératives, appelé « synucléinopathies », dont font partie, entre autres, la maladie de Parkinson, l'atrophie multi-systématisée et la démence à corps de Lewy (Spillantini *et al.* 1998). Ces pathologies sont toutes caractérisées par la présence de corps d'inclusions, composés d'agrégats insolubles d'α-synucléine fibrillaire, s'accumulant dans le cytoplasme des neurones ou des cellules gliales. De plus, certaines formes héréditaires de ces protéinopathies (comme les formes familiales de la maladie de Parkinson) sont dues à des mutations ponctuelles dans le gène de l'α-synucléine, voire à des variations du nombre de copies de celui-ci, renforçant le lien entre l'apparition de formes altérées ou surabondantes de cette protéine et le développement de troubles neurodégénératifs (Polymeropoulos *et al.* 1997; Singleton *et al.* 2003).

Ainsi, l'α-synucléine est au cœur de mécanismes neurodégénératifs dont la compréhension conditionne les développements futurs de tests de diagnostic ou de traitements préventifs, voire curatifs, qui permettront une meilleure prise en charge des patients atteints de maladies neurodégénératives.

I. Généralités sur l'α-synucléine

La famille des synucléines est composée de trois protéines, l'α-, la β- et la γ-synucléine, codées par trois gènes distincts uniquement présents chez les vertébrés. Les synucléines sont des petites protéines, solubles, intracellulaires, possédant toutes un domaine N-terminal hautement conservé et majoritairement composé de répétitions imparfaites de 11 amino-acides, pouvant former des hélices α leur permettant de se lier aux doubles couches phospholipides. Leurs rôles physiologiques sont peu connus. L'α- et la β-synucléine sont principalement localisées au niveau des terminaisons synaptiques du système nerveux central ; alors que la γ-synucléine est majoritairement exprimée dans le système nerveux périphérique, dans la rétine et dans des cancers du sein métastatiques (George 2002).

C'est en 1988 que les synucléines sont identifiées pour la première fois par Luc Maroteaux, à l'Université de Stanford en Californie. Il utilise un antisérum de lapin immunisé avec des vésicules synaptiques cholinergiques issues de l'organe électrique de *Torpedo Californica*, une raie électrique du Pacifique, pour cribler une banque d'ADNc (Acide DésoxyriboNucléique complémentaire). Ce criblage lui permet d'isoler un vecteur d'expression codant pour une protéine neuronale de 143 acides aminés chez la torpille. Le criblage d'une autre banque d'ADNc, construite avec des ARNm (Acide RiboNucléique messager) issus de cerveaux de rats, aboutit lui aussi à la sélection d'un clone codant pour une protéine de 140 acides aminés, présentant une très forte homologie de séquence avec celle du *Torpedo*. Luc Maroteaux décrit cette petite protéine neuronale, présente sous trois formes de 17.5, 18.5 et 20.0 kDa, comme étant abondamment exprimée dans le système nerveux. Il la baptise « synucléine », en raison de sa localisation au niveau du cytoplasme des terminaisons nerveuses pré**sy**naptiques et des noyaux neuronaux (**nuclei**) (Maroteaux *et al.* 1988).

Puis, c'est en 1994 que Ross Jakes du Laboratoire de Biologie Moléculaire de Cambridge, purifie à partir de cerveaux humains deux protéines de 140 et de 134 acides aminés :

- La protéine de 140 acides aminés est identifiée comme étant similaire au précurseur du composé non-Aβ des plaques amyloïdes de la maladie d'Alzheimer, celui-ci étant lui-même homologue à la synucléine précédemment décrite chez la raie électrique et le rat,
- La protéine de 134 acides aminés se trouve être l'homologue humain de la phosphoneuroprotéine 14 bovine.

Ces deux protéines ayant 61% de leur séquence en commun, Ross Jakes décrète qu'elles appartiennent toutes deux à la famille des synucléines et attribue les noms d'α- et de β-synucléine, respectivement aux protéines de 140 et de 134 acides aminés (Jakes *et al.* 1994).

De 1994 à 1997, beaucoup de recherches sont initiées autour du fait qu'un fragment de l'α-synucléine a été identifié comme correspondant au composé non-Aβ des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer ; mais cette découverte n'a permis en réalité que très peu d'avancées visant à clarifier la pathogénèse de cette maladie.

Toutefois, dès 1997, un nouvel engouement pour l'étude de l'α-synucléine est déclenché par les résultats de Mihael Polymeropoulos du National Institutes of Health qui établissent une relation entre des cas héréditaires de la maladie de Parkinson et des mutations ponctuelles du gène de l'α-synucléine (Polymeropoulos *et al.* 1997). Peu après, des analyses *post-mortem* de cerveaux de patients atteints de la forme sporadique de la maladie de Parkinson, ont révélé la présence d'α-synucléine au sein des corps de Lewy, qui sont des lésions caractéristiques de cette maladie (Spillantini *et al.* 1997). Puis, l'α-synucléine a été identifiée dans d'autres maladies neurodégénératives, proches de la maladie de Parkinson, comme la démence à corps de Lewy ou l'atrophie multi-systématisée, conduisant à regrouper ces pathologies sous la terminologie « synucléinopathies » (Baba *et al.* 1998; Spillantini *et al.* 1998; Tu *et al.* 1998).

I-1 L'α-synucléine, protéine présynaptique

a) Du gène à la protéine

L'α-synucléine est une protéine présente de façon ubiquitaire chez les vertébrés. Elle est le produit du gène *snca*, localisé chez l'homme sur le chromosome 4 (4q21-q23) (Chen *et al.* 1995) et chez la souris sur le chromosome 6 (Touchman *et al.* 2001). Les gènes humains et murins sont constitués de 6 exons dont 5 sont transcrits, donnant alors la forme majoritaire de l'α-synucléine possédant 140 acides aminés. Sa séquence est hautement conservée entre les espèces (Clayton *et al.* 1998; George 2002) : les α-synucléines humaines et murines partagent ainsi 95% d'identité. Seuls 7 acides-aminés divergent, dont l'acide-aminé en position 53 qui est de façon physiologique une alanine chez l'homme alors qu'il s'agit d'une thréonine chez les rongeurs et les primates. Cette variation est intéressante à noter car la substitution de l'alanine par une thréonine en position 53 correspond chez l'homme à une mutation pathologique responsable d'une forme héréditaire de la maladie de Parkinson (Polymeropoulos *et al.* 1997; Touchman *et al.* 2001).

L'α-synucléine peut être divisée en trois régions (Uversky 2007) (Fig. 1) :

- La partie N-terminale (acides aminés 1 à 60), qui est le siège de trois mutations ponctuelles faux-sens de l'α-synucléine liées à l'apparition précoce de symptômes parkinsoniens. La mutation A53T (identifiée chez une famille italo-américaine, les Contursi) (Polymeropoulos *et al.* 1997) et la mutation A30P (décrite chez une famille

allemande) (Kruger *et al.* 1998) sont responsables de formes héréditaires de la maladie de Parkinson. La mutation E46K a été identifiée chez une famille espagnole présentant une forme héréditaire autosomique dominante de démence à corps de Lewy (parkinsonisme associé à des démences et des hallucinations visuelles) (Zarranz *et al.* 2004). Ces trois mutations accroissent la capacité des intermédiaires partiellement conformés de l'α-synucléine à s'agréger (Li *et al.* 2001; Greenbaum *et al.* 2005). La partie N-terminale comporte aussi quatre répétitions imparfaites de 11 amino-acides contenant un motif hexamérique hautement conservé [KTKEGV = lysine – thréonine – lysine – acide glutamique – glycine – valine]. L'alternance périodique de résidus hydrophobes au sein de ce motif est propice à la formation d'hélices α amphipathiques permettant à la protéine d'interagir avec les membranes cellulaires (George *et al.* 1995),

- La région centrale de l'α-synucléine (acides aminés 61 à 95), qui possède elle aussi deux répétitions de 11 acides aminés contenant l'hexamère hautement conservé. De plus, cette séquence, également appelée NAC (pour Non Amyloid Component), est fortement encline à l'agrégation,
- La partie C-terminale de la protéine (acides aminés 96 à 140), qui est riche en prolines et en résidus acides. Cette région très chargée négativement interagit avec le dodécylsulfate de sodium (SDS pour Sodium DodecylSulfate), formant ainsi des liaisons faibles responsables du ralentissement de la migration des molécules d'α-synucléine en électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE pour Sodium DodecylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) (Bennett 2005). Ainsi, l'α-synucléine a un poids moléculaire apparent en SDS-PAGE de 19 kDa, alors que d'après sa séquence d'acides aminés, son poids calculé via SwissProt est de 14.46 kDa. La spectrométrie de masse (MALDI-TOF pour Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight mass spectrometry) confirme ce chiffre en évaluant le poids moléculaire de l'α-synucléine à 14.463 kDa.

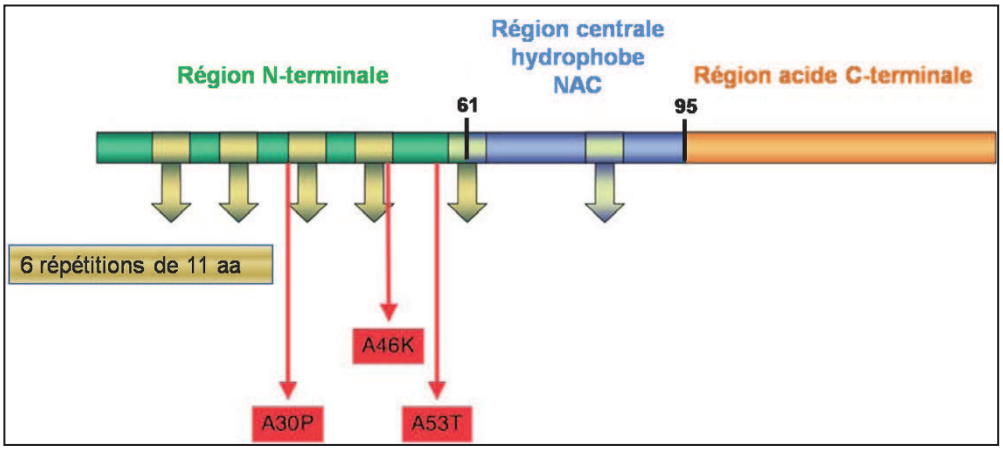


Fig. 1 : Localisation des motifs répétés et des mutations pathologiques au sein de la séquence de l'α-synucléine
L'α-synucléine possède 6 répétitions imparfaites de 11 acides aminés propices à la formation d'hélices α amphipatiques, localisées dans les parties amino-terminale et centrale de la protéine. Les 3 mutations ponctuelles responsables de formes héréditaires de la maladie de Parkinson sont portées par la partie N-terminale de l'α-synucléine
Figure tirée de la thèse de Samareh Azeredo Da Silveira Lajaunias présentée en 2008 à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne

b) Plasticité conformationnelle

Physiologiquement, l'α-synucléine n'a pas de structure secondaire définie : c'est une protéine intrinsèquement dépliée (natively unfolded protein), soluble dans le cytosol (Weinreb *et al.* 1996).

Elle peut aussi interagir avec les phospholipides membranaires en formant une ou deux hélices α situées dans sa partie N-terminale (Davidson *et al.* 1998; Kim *et al.* 2006) (Fig. 2).

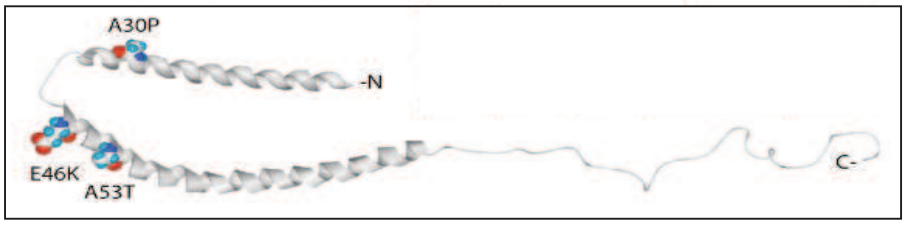


Fig. 2 : Représentation tridimensionnelle des deux hélices α de l'α-synucléine

En fonction de l'environnement physico-chimique dans laquelle elle se trouve, elle peut également adopter une structure secondaire en feuillets β. Cette transconformation est l'étape préalable aux processus de dimérisation puis d'oligomérisation qui conduit à la synthèse des formes pathologiques de l'α-synucléine (Uversky 2007).

c) Localisation

Si l'α-synucléine est essentiellement une protéine neuronale, elle peut être aussi présente dans les cellules gliales. Dans le système nerveux central, l'α-synucléine est exprimée dans le néocortex, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le striatum, le thalamus et le cervelet. Elle est moins abondante dans le tronc cérébral (Iwai *et al.* 1995).

Au niveau périphérique, elle est produite en plus faible quantité dans les plaquettes, les cellules hématopoïétiques, les cellules des jonctions neuromusculaires, les muscles squelettiques, le tissu cardiaque et les oligodendrocytes (Norris *et al.* 2004).

A l'échelle subcellulaire, l'α-synucléine est essentiellement présente dans les terminaisons présynaptiques (Kahle *et al.* 2000). Des immunomarquages de cultures primaires de neurones (Specht *et al.* 2005) et de coupes de cerveaux de rats (Yu *et al.* 2007) ou de souris C57Bl/6 (Vivacqua *et al.* 2010) ont permis de la situer également au niveau nucléaire. Une étude récente sur des cerveaux de rats a révélé que l'α-synucléine est aussi présente au niveau de la membrane interne mitochondriale de neurones situés dans le bulbe olfactif, l'hippocampe, le striatum et le thalamus (Liu *et al.* 2009).

L'α-synucléine est exprimée très tôt au cours du développement du cerveau chez l'homme : dès 11 semaines de gestation, l'α-synucléine apparaît dans les péricaryons des neurones des structures fœtales corticales (Raghavan *et al.* 2004). Elle est présente dans la s*ubstantia nigra* à 15 semaines (Galvin *et al.* 2001b). A partir de 20 semaines et jusque dans les premières années de l'enfance, l'α-synucléine peut être détectée au niveau des péricaryons de quelques groupes de neurones de l'hippocampe, des ganglions de la base et du tronc cérébral. Dans le cervelet, l'α-synucléine est présente à partir de la 21ème semaine de gestation et continue à y être exprimée chez l'adulte. Progressivement, au cours des premières années de l'enfance, elle disparait des péricaryons et seul le neuropile reste immunoréactif à l'âge adulte. L'apparition d'agrégats d'α-synucléine dans le cytosol des corps cellulaires des neurones de patients parkinsoniens pourrait être liée à la réactivation de certains signaux spécifiques aux premières étapes de développement du cerveau (Raghavan *et al.* 2004).

d) Fonctions physiologiques

Bien que l'α-synucléine soit une protéine abondamment présente dans le cerveau, ses fonctions physiologiques restent mal connues. Le fait qu'elle soit une protéine intrinsèquement dépliée lui confère une flexibilité conformationnelle lui permettant d'interagir avec de nombreux ligands et protéines (Uversky 2007).

Trafic vésiculaire

Les parties N- et C-terminales de l'α-synucléine présentent un motif homologue à celui des protéines liant les acides gras, suggérant l'implication de l'α-synucléine dans le métabolisme et le transport de ces molécules (Sharon *et al.* 2001). Ainsi, en s'associant aux doubles couches phospholipidiques membranaires, l'α-synucléine serait capable d'en modifier la fluidité et l'intégrité (Madine *et al.* 2006). Cette aptitude à interagir avec les membranes suggère l'implication de l'α-synucléine dans la libération et le renouvellement des vésicules, modulant ainsi les trafics vésiculaires aux niveaux de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et des synapses (Clayton *et al.* 1999; Fortin *et al.* 2005; Thayanidhi *et al.* 2010). Ainsi, l'α-synucléine pourrait être impliquée dans la régulation du bourgeonnement des vésicules synaptiques *via* l'inhibition de la phospholipase D2 (Jenco *et al.* 1998; Ahn *et al.* 2002; Payton *et al.* 2004). Toutefois, l'existence du rôle modulateur de l'α-synucléine sur cette activité enzymatique est fortement controversé (Rappley *et al.* 2009).

Le rôle de l'α-synucléine dans la transmission synaptique a aussi été mis en évidence chez son homologue aviaire : la synelfine. L'expression de cette protéine est transitoirement augmentée lors de l'apprentissage du chant chez le diamant mandarin, modifiant ainsi la plasticité synaptique permettant de renforcer ou de réprimer certains circuits neuronaux (George *et al.* 1995).

Métabolisme de la dopamine

L'α-synucléine participe à la régulation de la synthèse de la dopamine en inhibant directement la tyrosine hydroxylase qui, lorsqu'elle est phosphorylée, catalyse la transformation de L-tyrosine en L-DOPA (L-dihydroxyphénylalanine). L'α-synucléine agit aussi de façon indirecte en activant la phosphatase PP2A, laquelle provoque la déphosphorylation et donc l'inhibition de la tyrosine hydroxylase (Perez *et al.* 2002; Lou *et al.* 2010). L'α-synucléine est également capable de se lier à la protéine 14-3-3, empêchant celle-ci de remplir ces fonctions de stimulation de la tyrosine hydroxylase et d'inhibition de l'apoptose (Ostrerova *et al.* 1999; Xu *et al.* 2002).

De plus, l'α-synucléine inhibe la recapture de la dopamine au niveau de l'espace inter-synaptique en atténuant l'activité du transporteur de la dopamine (Wersinger *et al.* 2003).

Enfin, la dopamine peut se lier de façon covalente à la partie C-terminale de l'α-synucléine, limitant la formation de fibrilles d'α-synucléine (Norris *et al.* 2005).

Rôle protecteur

Plusieurs études *in vitro* suggèrent que l'α-synucléine serait impliquée dans des mécanismes de protection des cellules, en préservant les neurones de stimuli apoptotiques et en inactivant des

voies de signalisation cellulaire impliquées dans la réponse au stress oxydatif (Hashimoto *et al.* 2002; Casalone *et al.* 2004; Quilty *et al.* 2006; Tofaris *et al.* 2007).

Certaines activités de l'α-synucléine pourraient s'apparenter à celles des protéines chaperonnes (Kim *et al.* 2000; Souza *et al.* 2000b) : entre autres, en se liant aux phospholipides membranaires, l'α-synucléine agirait de façon synergique avec la CSP-α (Cystein String Protein), qui est une protéine co-chaperonne abondamment présente au niveau des synapses. Ainsi, l'α-synucléine assisterait la CSP-α afin d'assurer le repliement tridimensionnel adéquat des protéines SNAREs (Soluble NSF Attachment protein Receptor) essentielles à la libération des neurotransmetteurs et au recyclage des vésicules synaptiques (Bonini *et al.* 2005; Chandra *et al.* 2005).

En définitive, la plasticité conformationelle de l'α-synucléine lui permet d'interagir avec de nombreux ligands ; et si le rôle physiologique de l'α-synucléine reste flou, les découvertes de ces interactions sont autant de données dévoilant les fonctions cellulaires dans lesquelles l'α-synucléine est potentiellement impliquée. Toutefois, l'ensemble des fonctions remplies par l'α-synucléine doit pouvoir être compensé par des mécanismes alternatifs : en effet, les souris n'exprimant pas l'α-synucléine, suite à une délétion spontanée (Specht *et al.* 2001; Specht *et al.* 2004) ou suite à une invalidation par recombinaison homologue (knock-out) du gène *snca* (Cabin *et al.* 2002), ne présentent pas de phénotype pathologique sévère. Ce n'est qu'au niveau moléculaire qu'ont pu être mises en évidence des anomalies de la libération des neurotransmetteurs dans l'espace intersynaptique (Abeliovich *et al.* 2000; Cabin *et al.* 2002).

I-2 L'α-synucléine & neurotoxicité

Si l'α-synucléine est une protéine présente de façon physiologique dans le système nerveux central, c'est surtout pour son rôle critique dans plusieurs maladies neurodégénératives qu'elle est connue et étudiée. En effet, plusieurs observations convergentes permettent de désigner la forme altérée de l'α-synucléine comme étant l'un des facteurs clés de la pathogénèse de la maladie de Parkinson et des troubles neurologiques qui lui sont associés :

- Tout d'abord, il existe des formes héréditaires de la maladie de Parkinson qui ont pour origine des mutations ponctuelles (Polymeropoulos *et al.* 1997; Kruger *et al.* 1998; Zarranz *et al.* 2004) ou des duplications (Chartier-Harlin *et al.* 2004) / triplications (Singleton *et al.* 2003) du gène *snca* codant pour l'α-synucléine. Ces rares cas de maladie de Parkinson ont historiquement permis de faire le lien entre l'altération de l'α-

synucléine et l'apparition de troubles neurologiques (Goedert 1997; Nussbaum *et al.* 1997; Polymeropoulos *et al.* 1997),

- De plus, les filaments d'α-synucléine (10 – 15 nm de largeur) sont les constituants majeurs des inclusions intra-neuronales pathologiques, appelées corps de Lewy, qui sont caractéristiques de la maladie de Parkinson et de la démence à corps de Lewy (Spillantini *et al.* 1997). De même, les inclusions gliales cytoplasmiques, présentes dans l'atrophie multi-systématisée sont aussi composées majoritairement d'α-synucléine (Wakabayashi *et al.* 1998),
- Enfin, des techniques d'immunomarquage permettent de faire une corrélation entre la présence en abondance de formes filamenteuses intracytoplasmiques d'α-synucléine et la perte substantielle de neurone, caractéristique de ces maladies (Crowther *et al.* 2000).

a) Les formes pathologiques de l'α-synucléine

Les formes physiologiques de l'α-synucléine (dépliée et soluble dans le cytoplasme ou en hélice α N-terminale liée aux membranes) seraient en équilibre avec des intermédiaires partiellement conformés, ayant tendance à adopter une structure majoritairement composée de feuillets β anti-parallèles. Cette transconformation confère aux molécules d'α-synucléine la possibilité de s'associer les unes aux autres, *via* des résidus hydrophobes portés par le domaine NAC (Uversky *et al.* 2001a; Waxman *et al.* 2009b). Plusieurs arguments ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel de la région NAC de l'α-synucléine dans les processus d'oligomérisation :

- La substitution ou la délétion d'un seul acide aminé dans la région 68 à 76 inhibe l'agrégation de l'α-synucléine (Giasson *et al.* 2001),
- De plus, la séquence en acides aminés de la partie centrale de l'α-synucléine présente des similitudes (Glycine – Alanine – acide aminé aliphatique – acide aminé aliphatique) avec celles d'autres protéines amyloïdogènes comme les protéines prion ou β-amyloïde (Uversky *et al.* 2002a),
- Des molécules d'α-synucléines recombinantes délétées de la région NAC sont incapables de s'oligomériser *in vitro,* mettant en évidence le rôle primordial des acides aminés 71 à 82 dans la formation de fibrilles (Giasson *et al.* 2001; Miake *et al.* 2002),
- Enfin, bien que l'α-synucléine partage 78% d'homologie de séquence avec la β-synucléine, cette dernière, qui ne possède pas les acides aminés 73 à 83, ne s'agrège pas (Biere *et al.* 2000).

Cette première étape de la formation de fibrilles, qui correspond à l'agencement de plusieurs monomères d'α-synucléine entre eux, est un processus lent et critique appelé nucléation (Wood *et*

al. 1999). Ce noyau de protéines agrégées est ensuite capable d'initier une oligomérisation rapide : c'est la phase d'élongation au cours de laquelle les feuillets β des différentes molécules d'α-synucléine se disposent parallèlement les uns aux autres, créant des filaments. En se plaçant de façon parallèle les uns aux autres, les filaments s'organisent ensuite en protofibrilles, puis en fibrilles (Chen *et al.* 2007) (Fig.3).

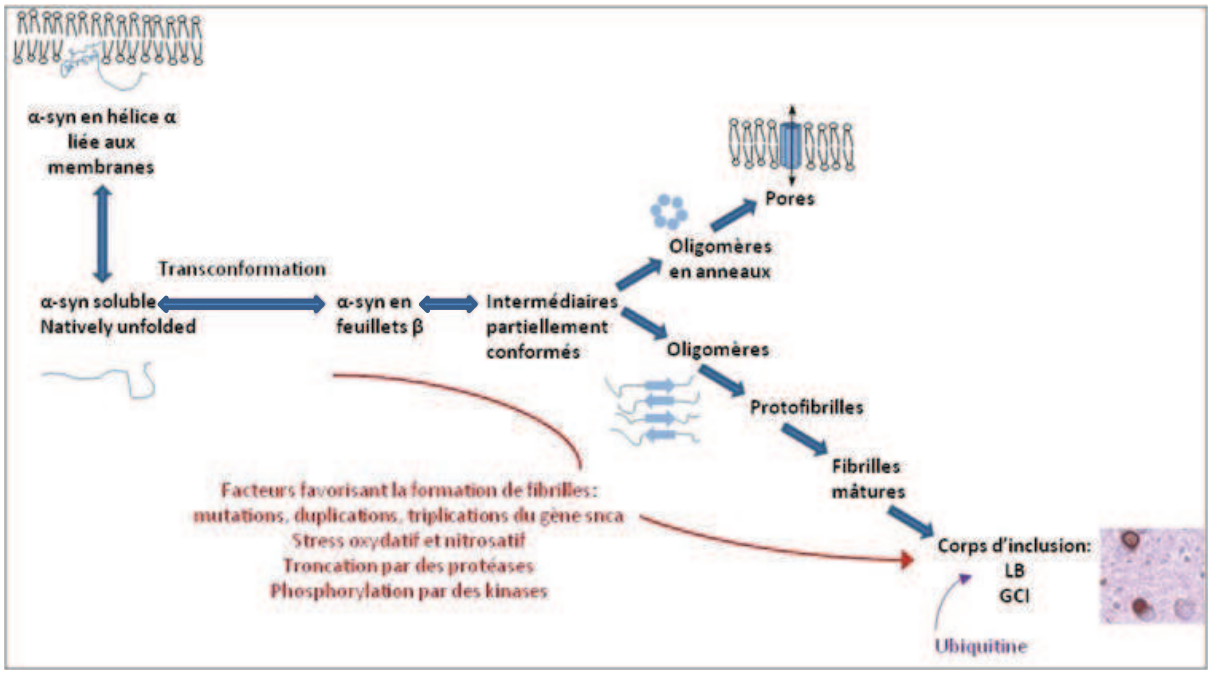


Fig. 3 : Les différents états de conformation et d'oligomérisation de l'α-synucléine
(LB : Lewy Bodies – corps de Lewy ; GCI Glial Cytoplasmic Inclusions – inclusions gliales cytoplasmiques)

Les fibrilles, associées à une pathologie de l'α-synucléine, ont des caractéristiques biochimiques particulières : elles sont insolubles dans les détergents et présentent des propriétés différentes de la forme physiologique de l'α-synucléine en présence d'enzymes protéolytiques comme la calpaïne (Mishizen-Eberz *et al.* 2003), la neurosine (Kasai *et al.* 2008) ou la protéinase K (PK). La résistance partielle à la PK de fibrilles d'α-synucléine générées *in vitro* ou extraites de cerveaux de patients atteints de synucléinopathies est portée par le domaine central NAC, situé au cœur des agrégats (Miake *et al.* 2002; Neumann *et al.* 2004).

Si les fibrilles matures sont les constituants majeurs des inclusions intracytoplasmiques pathologiques caractéristiques des synucléinopathies, elles ne seraient pas les formes les plus cytotoxiques de l'α-synucléine: ainsi, certains modèles murins transgéniques présentent des dépôts d'α-synucléine sans signe évident de neurotoxicité (Kahle *et al.* 2001) ; et à l'inverse, la surexpression d'α-synucléine mutée dans des neurones en culture peut être très délétère sans qu'il ne soit observé

pour autant des corps d'inclusions (Petrucelli *et al.* 2002). Le piégeage des fibrilles au sein de corps d'inclusion pourrait être un mécanisme de défense cellulaire permettant de neutraliser leur action. Ainsi, la neurotoxicité serait d'avantage portée par les oligomères solubles partiellement conformés (Volles *et al.* 2003). Ces formes intermédiaires, altérées de l'α-synucléine auraient la capacité de s'organiser en anneaux (Ding *et al.* 2002; Pountney *et al.* 2005), puis de former des pores en s'enchâssant dans les doubles couches phospholipidiques, perturbant ainsi la perméabilité membranaire (Lashuel *et al.* 2002; Waxman *et al.* 2009a) (Fig.3).

b) Facteurs influençant l'oligomérisation de l'α-synucléine

Des fibrilles ayant des caractéristiques structurales comparables à celles extraites de cerveaux parkinsoniens peuvent être produites à partir d'α-synucléine recombinante, offrant la possibilité d'étudier *in vitro* les facteurs modulant son oligomérisation.

Facteurs physico-chimiques

L'α-synucléine est sensible aux propriétés physico-chimiques de l'environnement dans lequel elle se trouve. Ainsi, des fortes concentrations en anions, en sels, en ions métalliques, un pH acide ou des températures élevées peuvent engendrer son agrégation (Uversky *et al.* 2001a; Uversky *et al.* 2001b; Yagi *et al.* 2005; Uversky 2007).

Fortes concentrations d'α-synucléine

Des fortes concentrations d'α-synucléine accélèrent la croissance de fibrilles *in vitro* (Uversky *et al.* 2001b). *In vivo*, la surproduction d'α-synucléine associée à la duplication ou à la triplication du gène *snca* est responsable de formes héréditaires de la maladie de Parkinson, laissant présager d'un lien entre accumulation d'α-synucléine et neurotoxicité.

Facteurs génétiques

Des études *in vitro*, réalisées à l'aide de molécules recombinantes d'α-synucléine, montrent que les 3 mutations ponctuelles identifiées comme étant responsables de cas héréditaires de parkinsonisme confèrent toutes à l'α-synucléine une capacité accrue à s'oligomériser. Les mutations E46K et A53T du gène *snca* sont ainsi associées à une accélération de la formation de fibrilles (Conway *et al.* 1998; Li *et al.* 2001; Greenbaum *et al.* 2005). En ce qui concerne la mutation A30P, si certains auteurs mentionnent le fait qu'elle favoriserait également la formation de filaments (Giasson *et al.* 1999; Narhi *et al.* 1999), d'autres semblent indiquer, au contraire, qu'elle engendrerait la formation d'oligomères non-fibrillaires (Conway *et al.* 2000b).

Epissage alternatif

En plus de la forme majoritaire de 140 acides aminés générée par la transcription complète des cinq exons codant du gène *snca*, l'α-synucléine possède deux autres isoformes (Beyer 2006):

- D'une part, une isoforme de 126 acides aminés générée par l'épissage alternatif de l'exon 3 codant pour les résidus 41 à 54, et donc dépourvue de deux des trois sites (E46K et A53T) pouvant être porteur de mutations pathologiques responsables des formes héréditaires de la maladie de Parkinson. L'épissage de l'exon 3 a aussi pour conséquence d'interrompre la formation d'hélices α et donc de perturber l'interaction de l'α-synucléine 126 avec les membranes cellulaires. Cette isoforme préviendrait la formation d'agrégats d'α-synucléine (Lee *et al.* 2002a; Jao *et al.* 2008),
- D'autre part, une isoforme de 112 acides aminés, générée par l'épissage alternatif de l'exon 5 codant pour les résidus C-terminaux 103 à 130, et qui serait particulièrement enclin à l'agrégation (Conway *et al.* 2000a; Conway *et al.* 2001).

Troncation

Les formes tronquées en C-terminal de l'α-synucléine ont une capacité à générer des fibrilles *in vitro* supérieures à celle de la molécule entière (Murray *et al.* 2003; Hoyer *et al.* 2004). *In vivo*, les corps de Lewy ou les inclusions gliales intracytoplasmiques sont riches en α-synucléine tronquée en C-terminal (Miake *et al.* 2002; Li *et al.* 2005; Liu *et al.* 2005).

Phosphorylation

Au sein des lésions α-synucléinopathiques, l'α-synucléine est très largement présente sous sa forme phosphorylée en sérine 129 (Anderson *et al.* 2006; Beyer 2006; Kragh *et al.* 2009) : plus de 90% de l'α-synucléine insoluble dans les détergents purifiée à partir de cerveaux de patients atteints de démence à corps de Lewy est phosphorylée en sérine 129 (Fujiwara *et al.* 2002). Ce taux est 30 fois supérieur à celui détecté dans les cerveaux contrôles de patients indemnes de synucléinopathies (Anderson *et al.* 2006). Par ailleurs, dans le cerveau d'un rat adulte normal, moins de 4% de l'α-synucléine serait phosphorylée (Fujiwara *et al.* 2002). En conséquence, la détection de cette modification post-traductionnelle apparait comme un critère signant de façon robuste la présence d'une pathologie liée à l'α-synucléine (Kovacs *et al.* 2010a). Toutefois, l'influence de la phosphorylation sur la capacité de l'α-synucléine à former des fibrilles et sur la pathogénèse des synucléinopathies reste mal connue. Ainsi, certaines études *in vitro* montrent que cette phosphorylation lui confèrerait une capacité accrue à s'oligomériser (Fujiwara *et al.* 2002) et à s'accumuler sous forme de corps d'inclusion dans des cellules en culture (Smith *et al.* 2005) ; mais d'autres résultats réfutent ces premières conclusions en mentionnant que la phosphorylation en

sérine 129 augmente la flexibilité conformationelle de l'α-synucléine et inhibe la formation de fibilles (Paleologou *et al.* 2008). De même, des publications suggèrent que la phosphorylation promouvrait la dissociation de l'α-synucléine des vésicules (Pronin *et al.* 2000) afin de permettre son accumulation dans le cytoplasme puis sa dégradation par le protéasome, lequel n'est capable de lyser l'α-synucléine que lorsque celle-ci est dissociée des membranes (Liu *et al.* 2005). D'autres données *in vitro* au contraire décrivent que la phosphorylation ne modifie pas la capacité de l'α-synucléine à interagir avec les phospholipides membranaires (Paleologou *et al.* 2008).

D'autres sites de l'α-synucléine sont susceptibles d'être phosphorylés, mais à des niveaux bien moindres : il s'agit de la sérine en position 87 et des 4 résidus tyrosine en position 39, 125, 133 et 136. La position critique du résidu sérine 87, au cœur du domaine NAC, laisse penser que sa phosphorylation pourrait avoir un impact important sur les propriétés de l'α-synucléine. Ainsi, une étude récente montre que la phosphorylation de l'α-synucléine en position 87 bloquerait la formation de fibrilles et diminuerait considérablement sa capacité à se lier aux membranes (Paleologou *et al.* 2010). Cette même étude commente le fait que le niveau de phosphorylation de la sérine 87 serait augmenté dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et l'atrophie multi-systématisée (aucune donnée n'étant relative à la maladie de Parkinson dans cet article) (Paleologou *et al.* 2010). Enfin, si peu de résultats sont disponibles sur l'impact de la phosphorylation des tyrosines, une étude *in vitro* montre que la phosphorylation du résidu 125 provoquerait l'inhibition de l'oligomérisation (Negro *et al.* 2002).

Stress nitrosant et oxydant

La capacité de l'α-synucléine à former des oligomères est influencée par son exposition à des stress nitrosants ou oxydants. Ainsi, *in vitro* l'exposition de molécules d'α-synucléine recombinante à des agents nitrants déclenche la formation d'oligomères stables à la chaleur et en présence de SDS. La nitration de l'α-synucléine, qui correspond à l'ajout de groupements NO_2 essentiellement au niveau de ses résidus tyrosine, permet ensuite la synthèse, via des réactions d'oxydation, de liaisons O, O'-dityrosine. La formation de ces liaisons covalentes entre différentes molécules d'α-synucléine rend irréversibles ces phénomènes de polymérisation (Souza *et al.* 2000a). Cette observation faite *in vitro* est confortée par l'immunodétection de filaments insolubles d'α-synucléine nitrée, au sein de corps d'inclusions pathologiques de patients atteints de synucléinopathies (Giasson *et al.* 2000).

A l'inverse de la nitration/oxydation des résidus tyrosines qui conduit à la stabilisation d'oligomères, l'oxydation complète des 4 méthionines de l'α-synucléine inhiberait la formation de fibrilles (Uversky *et al.* 2002b) *in vitro*.

Par ailleurs, il a aussi été décrit que le métabolisme même de la dopamine est un processus générateur de dérivés réactifs de l'oxygène pouvant avoir une influence sur l'état conformationnel

de l'α-synucléine (Xu *et al.* 2002; Cappai *et al.* 2005): ainsi, l'oxydation de l'α-synucléine par la dopamine inhibe la synthèse de fibrilles à partir de protofibrilles, provoquant l'accumulation de ces dernières (Conway *et al.* 2001).

Certaines études mettent en avant le fait que la surexpression ou les mutations A30P et A53T de l'α-synucléine accroîtraient la vulnérabilité des neurones au stress oxydant (Prasad *et al.* 2004; Jiang *et al.* 2007). A l'inverse, d'autres données suggèrent que l'exposition de cultures primaires de neurones à un stress oxydatif engendrerait une surexpression d'α-synucléine qui aurait un effet neuroprotecteur en préservant les cellules des phénomènes apoptotiques (Quilty *et al.* 2006).

Facteurs environnementaux

L'exposition à certains pesticides comme le paraquat (herbicide non-sélectif), le maneb (fongicide), la roténone (insecticide) ou à certains agents chimiques toxiques comme le MPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine - dérivé neurotoxique d'un opioïde de synthèse) est corrélée à un risque accru de développer la maladie de Parkinson (Brighina *et al.* 2008; Elbaz *et al.* 2009). Ces composés agissent en inhibant les complexes I ou III de la chaîne respiratoire mitochondriale ce qui génère un stress oxydatif ayant une influence sur les molécules d'α-synucléine. Ainsi, la paraquat, la roténone et le maneb favorisent la formation de fibrilles à partir d'α-synucléine *in vitro* (Uversky *et al.* 2001c; Manning-Bog *et al.* 2002). L'exposition de cellules ou de rongeurs à ces toxiques a permis d'élaborer des modèles d'étude *in vitro* ou *in vivo* d'altérations de l'α-synucléine.

c) Les corps d'inclusions

Les synucléinopathies sont un groupe de maladies neurodégénératives caractérisées par la présence, au niveau cérébral, d'inclusions pathologiques d'α-synucléine majoritairement sous forme insoluble et filamenteuse. Comme précédemment évoqué, la fonction même de ces corps d'inclusion (toxique ou neuroprotectrice ?) dans la pathogénèse de ces maladies reste encore une question non élucidée (Olanow *et al.* 2004). Il existe plusieurs types d'inclusion, appelées entre autres corps de Lewy, neurites de Lewy ou inclusions gliales intracytoplamsiques, en fonction de leur structure et de leur localisation.

Ainsi, les corps et les neurites de Lewy (Fig. 4), décrits pour la première fois en 1912 par Fritz Heinrich Lewy (Holdorff 2006), sont les lésions caractéristiques de la maladie de Parkinson et des démences à corps de Lewy (Forno 1996). Ce sont des dépôts intracellulaires de protéines et de lipides (Gai *et al.* 2000).

Sphéroïdes, les corps de Lewy sont principalement localisés au niveau du péricaryon des neurones. En microscopie électronique, ils apparaissent comme des structures d'une dizaine de micromètres de diamètre, ayant un noyau dense entouré d'un halo clair. *In situ*, ils peuvent être

visualisés par coloration à l'hématoxyline-éosine ou par immunohistochimie à l'aide d'anticorps anti α-synucléine ou anti ubiquitine, qui est aussi l'un de leurs constituants majeurs avec les neurofilaments (Baba *et al.* 1998; Shults 2006). Approximativement 90% de l'α-synucléine présentent au sein des corps de Lewy serait phosphorylée (Fujiwara *et al.* 2002; Anderson *et al.* 2006).

Les neurites de Lewy, également appelés neurites dystrophiques, qualifient quant à eux des inclusions filiformes, situées dans les axones des neurones (Fig. 4) (Dickson *et al.* 1991).

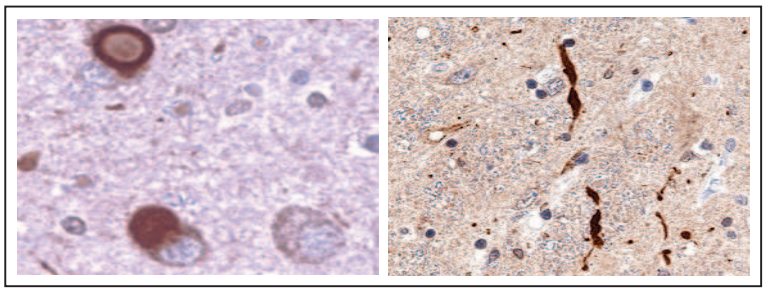


Fig. 4 : Corps de Lewy (à gauche) et neurites de Lewy (à droite) détectés par immunohistochimie avec l'anticorps anti α-synucléine AS11 dans un cerveau de patient atteint de la maladie de Parkinson (Mougenot *et al.* 2010)

Dans les cas d'atrophie multi-systématisée, les dépôts d'α-synucléine ne sont pas situés dans les neurones mais dans les oligodendrocytes: ce sont les inclusions gliales intracytoplasmiques (Tu *et al.* 1998). En plus de l'α-synucléine, elles contiennent de l'ubiquitine, de l'αB-crystalline, de l'α- et de la β-tubuline, mais pas de neurofilaments comme dans les corps de Lewy (Gai *et al.* 1999).

d) Mécanismes neurotoxiques

Les processus moléculaires inhérents à la toxicité de l'α-synucléine restent encore mal connus (Cookson *et al.* 2008; Sulzer 2010). La neurotoxicité de l'α-synucléine s'exprime principalement par la perturbation des mécanismes dans lesquels elle est impliquée *via* ses interactions avec d'autres molécules (Fig. 5).

Ainsi, la liaison de l'α-synucléine pathologique aux membranes lipidiques engendrerait, comme précédemment évoqué, une modification de leur perméabilité *via* la formation de pores. Elle perturbe aussi la transmission synaptique en altérant l'exocytose et la libération des neurotransmetteurs (Larsen *et al.* 2006; Nemani *et al.* 2010; Scott *et al.* 2010). De la même façon, elle bloque le trafic vésiculaire du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Gosavi *et al.* 2002; Cooper *et al.* 2006; Thayanidhi *et al.* 2010).

La toxicité de l'α-synucléine atteint également d'autres organelles, comme les mitochondries. Les altérations de l'α-synucléine engendrent un déficit des fonctions mitochondriales et notamment une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire, aboutissant à la fois à l'apparition d'oxygène réactif et à la perturbation de la synthèse d'ATP (Hsu *et al.* 2000; Devi *et al.*

2008). De plus, l'α-synucléine serait capable de déclencher des phénomènes apoptotiques (Saha *et al.* 2000; Kim *et al.* 2004; Gentile *et al.* 2008), dans lesquels la mitochondrie joue aussi un rôle central. Les relations de causes à effets entre l'apoptose, la toxicité de l'α-synucléine et les altérations des activités mitochondriales sont encore peu connus (Cookson 2009).

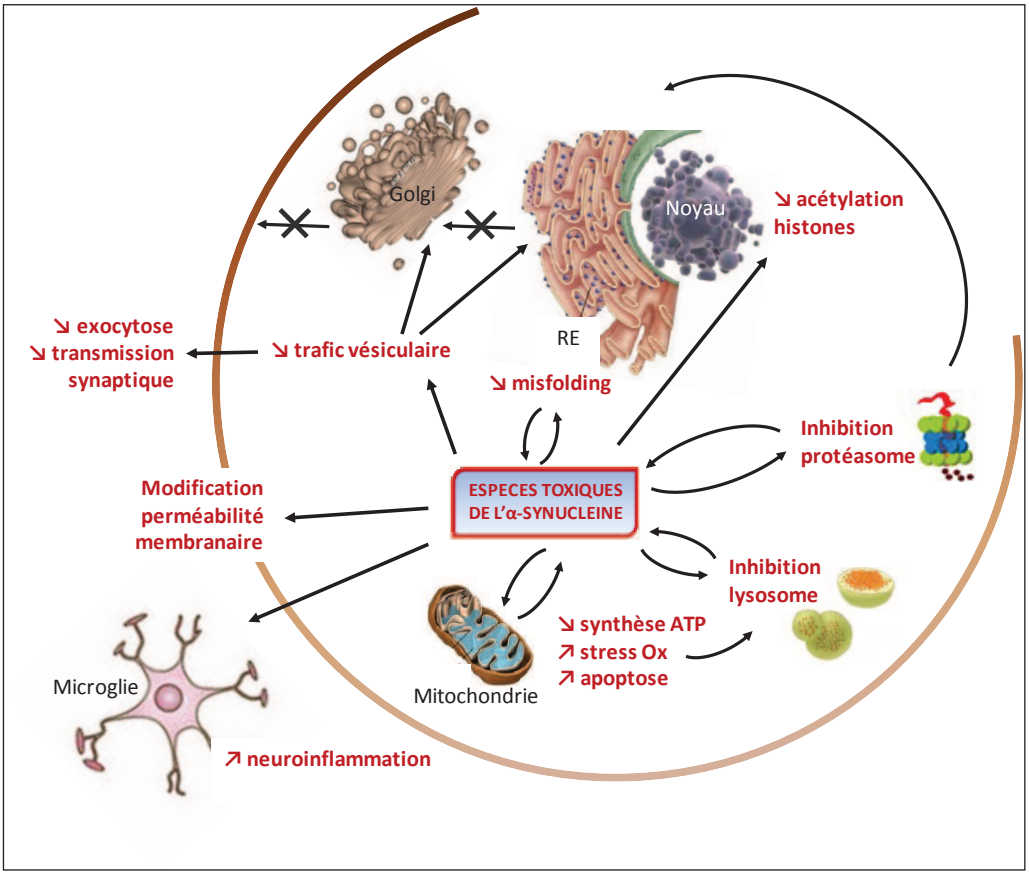


Fig. 5 : Les fonctions cellulaires endommagées par les espèces neurotoxiques de l'α-synucléine
Figure réalisée à partir d'images issues du site http://www.daviddarling.info

L'α-synucléine est aussi impliquée dans l'altération des deux principaux systèmes cellulaires de dégradation des protéines que sont le protéasome et le lysosome :

- D'une part, il a été montré *in vitro* que la surexpression d'α-synucléine mutée conduit à l'inhibition de la dégradation des protéines par le protéasome (Tanaka *et al.* 2001; Petrucelli *et al.* 2002; Emmanouilidou *et al.* 2010). En effet, les corps d'inclusion, principalement composés d'α-synucléine fibrillaire, sont également riches en ubiquitine (Hasegawa *et al.* 2002). Si l'ubiquitination permet d'adresser les molécules mal-conformées ou produites en surnombre aux systèmes protéolytiques cellulaires, elle conduirait également à un emballement de la neurotoxicité liée à l'α-synucléine. C'est en se liant à une sous-unité du complexe régulateur 19S (Snyder *et al.* 2003) ou au cœur

catalytique 20S du protéasome (Lindersson *et al.* 2004), que l'α-synucléine provoquerait son altération. La dégradation incomplète de l'α-synucléine génèrerait ainsi des fragments tronqués ayant une capacité accrue à s'agréger, comme précédemment évoqué. Ces agrégats endommageraient à leur tour l'activité du protéasome, exacerbant encore l'accumulation d'α-synucléine (Liu *et al.* 2005). De plus, l'α-synucléine phosphorylée pourrait être adressée directement au protéasome, sans être ni préalablement déphosphorylée, ni ubiquitinylée, accentuant la surcharge du système cellulaire de catabolisme des protéines (Machiya *et al.* 2010),

- D'autre part, l'α-synucléine peut aussi se lier aux membranes des lysosomes et affecter les fonctions lysosomales ainsi que les mécanismes d'autophagie régulées par des chaperones (Cuervo *et al.* 2004; Martinez-Vicente *et al.* 2008).

Par ailleurs, l'α-synucléine peut déclencher des processus neuroinflammatoires: sa libération dans l'espace extracellulaire par exocytose ou après la mort neuronale activent la réponse microgliale (Zhang *et al.* 2005; Lee *et al.* 2008b; Theodore *et al.* 2008; Lee *et al.* 2010a).

Enfin, dans certaines conditions, qu'il s'agisse d'intoxication de souris au paraquat (Goers *et al.* 2003) ou encore de surexpression de l'α-synucléine dans un modèle murin transgénique (Masliah *et al.* 2000; Richfield *et al.* 2002)], l'α-synucléine est observée au niveau du noyau où elle se lierait aux histones: cette interaction provoquerait l'agrégation de l'α-synucléine (Goers *et al.* 2003) et l'inhibition de l'acétylation des histones (Kontopoulos *et al.* 2006), promouvant la neurotoxicité.

A l'échelle de l'individu, la neurotoxicité de l'α-synucléine se traduit par des pathologies qui, bien qu'elles soient regroupées sous le terme de synucléinopathies, présentent des tableaux cliniques variés et complexes.

II. Les principales synucléinopathies et leur modélisation expérimentale

II-1 Les principales synucléinopathies

Les synucléinopathies sont un ensemble de protéinopathies neurodégénératives caractérisées par des lésions pathologiques composées d'agrégats d'α-synucléine. Ces lésions peuvent avoir diverses localisations cérébrales en fonction des pathologies et affecter des neurones ou des cellules gliales (Galvin *et al.* 2001a). Les principales synucléinopathies sont la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy et l'atrophie multi-systématisée (Jellinger 2003). A ces trois grandes maladies neurodégénératives s'ajoutent également les dystrophies neuroaxonales de l'adulte (neurodégénérescence avec accumulations cérébrales de fer de type I – maladie d'Hallervorden-Spatz), les atteintes autonomiques pures, les maladies à corps de Lewy diffus et les variants à corps de Lewy de la maladie d'Alzheimer (Uversky 2007).

a) La maladie de Parkinson

Elle a été décrite pour la première fois en 1817 par James Parkinson dans « An Essay on the Shaking Palsy » (Parkinson 2002). La maladie de Parkinson est une maladie neurologique chronique, qui se manifeste par des signes cliniques moteurs sévères et évolutifs, apparaissant de façon asymétrique : tremblements de repos, bradykinésie / akinésie, et rigidité musculaire. D'autres symptômes peuvent aussi être associés à cette triade clinique, de façon précoce (constipation, altération de l'odorat, troubles du sommeil, dépression…) et tout au long de la maladie (instabilité posturale, hypersudation, hypersalivation, hypotension orthostatique…). Des troubles cognitifs, voire une démence sont aussi parfois observés chez des patients âgés. La maladie de Parkinson est essentiellement une pathologie sporadique bien qu'il existe aussi de rares formes familiales.

L'atteinte de la voie dopaminergique est au cœur de la physiopathologie de la maladie de Parkinson et est responsable de la symptomatologie motrice décrite ci-dessus (Damier *et al.* 1999). Cependant, les altérations cérébrales ne se limitent pas exclusivement à la sphère dopaminergique puisque les voies adrénergiques, sérotoninergiques et cholinergiques sont également touchées. De même, plusieurs structures cérébrales sont atteintes au cours du développement de la pathologie : le bulbe olfactif et le *locus cœruleus* sont affectés en premiers, rendant compte des troubles initiaux de l'olfaction et du sommeil. Ensuite, la pathologie gagne des structures impliquées dans la régulation

motrice et situées dans la partie haute du tronc cérébral, comme la substance noire *pars compacta* contenant les corps cellulaires des neurones dopaminergiques riches en neuromélanine. Ensuite, *via* les projections de ces neurones dans le faisceau nigro-strié, la maladie s'étend au striatum (régissant les mouvements volontaires) puis, après plusieurs décennies d'évolution, à certaines structures corticales (problèmes de cognition et démence).

La maladie de Parkinson est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer : elle touche plus de 4 millions de patients dans le monde et environ 100 000 en France. Sa prévalence est d'1.6% chez les personnes âgées de plus de 65 ans.

Si, comme précédemment décrit, l'α-synucléine joue un rôle clé dans le développement de la maladie de Parkinson, elle n'est pas l'unique protéine impliquée dans son étiologie (Kovacs *et al.* 2010a), puisque des mutations dans plus de dix gènes distincts ont été identifiées comme étant responsables de formes héréditaires (autosomiques récessives ou dominantes) de cette pathologie. Le tableau ci-dessous présente quelques protéines codées par ces gènes ainsi que leur fonction (Tableau 1). Les locus des gènes impliqués dans des formes familiales de la maladie de Parkinson sont désignés par l'acronyme PARK suivi d'un chiffre. Ainsi, suite à l'identification des mutations ponctuelles du gène *snca,* l'α-synucléine a été nommé PARK1. Elle est aussi parfois appelée PARK4, acronyme choisi au moment de la découverte des triplications du gène *snca.*

Tableau 1 : gènes liés à des formes héréditaires de la maladie de Parkinson

Locus	Protéine	Hérédité	Fonction
PARK1	α-synucléine	AD	
PARK2	Parkin	AR	Ubiquitine-ligase dont la mutation engendre un défaut d'ubiquitinylation des protéines à dégrader, conduisant à l'accumulation de celles-ci
PARK3	inconnue	AD	/
PARK4	α-synucléine	AD	Triplication du gène *snca* engendrant l'accumulation de l'α-synucléine
PARK5	UCHL1	AD	Enzyme de désubiquitination dont la mutation perturbe l'hydrolyse les molécules d'ubiquitine fixées sur des protéines
PARK6	PINK1	AR	Protéine kinase mitochondriale dont la mutation augmente la susceptibilité au stress oxydatif et à l'apoptose
PARK7	DJ-1	AR	Co-activateur de transcription jouant un rôle dans les phénomènes de neuroprotection
PARK8	LRRK2	AD	Protéine kinase de fonction inconnue
PARK9	ATP13A2	AR	ATP synthétase dont la mutation perturbe la synthèse des molécules d'ATP
PARK10	Inconnue	AD	/
PARK11	inconnue	AD	/

UHCL1 : Ubiquitin Hydrolase Carboxy-terminal L1, PINK1 : Phosphatase and TENsin-Induced Putative Kinase 1, LRRK2 : Leucine-Rich Repeat Kinase 2, ATP : Adénosine Tri Phosphate, AR : Autosomique Récessive, AD : Autosomique Dominante
Adapté d'informations disponibles sur le site Movement Disorder Virtual University (http://www.mdvu.org)

Diagnostic de la maladie de Parkinson

Au début de la phase symptomatique, les critères diagnostiques à fortes valeurs positives prédictives sont : le tremblement de repos, l'asymétrie initiale des symptômes et le syndrome akinéto-rigide. Après un délai de 3 à 5 ans, lorsqu'un traitement pharmacologique à base de Lévodopa ou d'un agoniste dopaminergique est prescrit, la réponse substantielle du patient à ce traitement devient un critère positif utilisable pour le diagnostic clinique de la maladie de Parkinson. Cela permet d'écarter les autres syndromes parkinsoniens dégénératifs posant souvent un problème de diagnostic différentiel (comme par exemple l'atrophie multisystématisée et la démence à corps de Lewy), qui répondent moins bien au traitement dopaminergique à ce stade de la maladie (Gelb *et al.* 1999; 2000; Dickson *et al.* 2009).

Le lien entre la présence d'altérations de l'α-synucléine et la maladie de Parkinson fait de l'α-synucléine un biomarqueur potentiel et accessible de façon non-invasive puisque présent dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien (Foulds *et al.* 2010). De nombreuses études essaient d'établir une corrélation entre les quantités et/ou les formes (totale ou oligomérique) d'α-synucléine circulante et la présence d'un syndrome parkinsonien (Mollenhauer *et al.* 2010). Mais de telles études sont rendues difficiles par le fait que la présence d'α-synucléine au niveau périphérique n'est pas spécifique de la maladie de Parkinson puisque des formes circulantes de l'α-synucléine sont aussi détectées chez des sujets sains (El-Agnaf *et al.* 2006). Les variations de concentration de l'α-synucléine ne sont pas non plus spécifiques de la maladie de Parkinson puisqu'elles peuvent aussi être inhérentes au vieillissement normal, non pathologique des individus (Chu *et al.* 2007). Une autre difficulté majeure dans le diagnostic dans la maladie de Parkinson tient au fait qu'elle soit liée à une anomalie conformationnelle, impliquant la nécessité de savoir distinguer les formes physiologiques des formes pathologiques de l'α-synucléine.

L'identification d'une pathologie de l'α-synucléine (α-synucléine phosphorylée, neurites dystrophiques) dans des biopsies du système nerveux entérique réalisées par coloscopie, est également une voie envisagée pour le diagnostic *pre mortem* de la maladie de Parkinson (Lebouvier *et al.* 2010).

Le diagnostic de certitude de la maladie de Parkinson est établi seulement après autopsie du patient, par la typologie et l'analyse des lésions. Le cœur lésionnel de la maladie de Parkinson est l'atteinte du système nigrostriatal. Pour autant, cette maladie ne se résume pas à la destruction de ce seul système dopaminergique : d'autres systèmes dopaminergiques peuvent être atteints mais généralement avec une sévérité moins importante (comme par exemple les neurones dopaminergiques de la rétine ou de la paroi du tube digestif). Des lésions situées dans des systèmes non-dopaminergiques (comme les systèmes noradrénergiques, cholinergiques, sérotoninergiques ou le cortex) ont également été décrites chez des patients parkinsoniens (Defebvre *et al.* 2006). Les

analyses histologiques et immunohistochimiques *post-mortem* réalisées sur des coupes de cerveaux de patients atteints de maladie de Parkinson révèlent :

- une perte substantielle de neurones dopaminergiques dans la substance noire (*substantia nigra pars compacta*),
- la présence extracellulaire de mélanine, larguée par les neurones en cours de dégénérescence,
- une gliose réactionelle (inflammation et prolifération anormale de la névroglie),
- la présence de corps de Lewy et de neurites de Lewy, qui sont les éléments essentiels pour établir le diagnostic de certitude de la maladie de Parkinson. Ils apparaissant comme des inclusions intracytoplasmiques éosinophiles dans les neurones résiduels de la *substantia nigra pars compacta*.

Traitement de la maladie de Parkinson

Le traitement de référence de la maladie de Parkinson est la Lévodopa (ou L-Dopa). C'est un précurseur métabolique de la dopamine qui traverse la barrière hématoméningée vers les noyaux gris centraux où elle est décarboxylée en dopamine, remplaçant le neurotransmetteur manquant. Si elle est efficace à long terme sur la triade symptomatique "tremblement - rigidité - ralentissement", des fluctuations motrices et dyskinésies sévères apparaissent souvent après quelques années de traitement. C'est la raison pour laquelle un traitement à la L-Dopa n'est pas envisagé d'emblée chez les patients de moins de 70 ans, qui sont traités en première intention avec des doses croissantes d'agonistes dopaminergiques, permettant de favoriser la production de dopamine et sa réabsorption.

Les anticholinergiques (qui permettent de lutter contre les tremblements) et les inhibiteurs de la MAOB (MonoAmine Oxydase B) et de la COMT (Catechol-O-Methyl-Transferase) (qui limitent la dégradation de la dopamine) sont également utilisés pour le traitement de la maladie de Parkinson.

Pour les patients ne répondant plus au traitement médicamenteux, des solutions chirurgicales sont envisagées comme la destruction stéréotaxique du pallidum (pallidotomie) ou l'implantation d'électrodes permettant une stimulation électrique à haute fréquence du pallidum, du noyau sous-thalamique ou du noyau intermédiaire ventral du thalamus.

Depuis une vingtaine d'années, des traitements expérimentaux relevant de la thérapie cellulaire sont à l'essai. Ils consistent à greffer dans le striatum de patients des cellules mésencéphaliques, issues de fœtus humains de 6 à 9 semaines. Ces cellules, déjà engagées dans une voie de différenciation les conduisant à devenir des neurones dopaminergiques fonctionnels, sont transplantées dans le but de remplacer les neurones déficients de la voie nigro-striatale (Lindvall *et al.* 1990; Bjorklund *et al.* 2003; Kordower *et al.* 2008a; Kordower *et al.* 2008b; Li *et al.* 2008; Mendez

et al. 2008; Olanow *et al.* 2009b). Environ 500 patients dans le monde auraient ainsi été opérés. Les résultats de ces greffes sont très variables : ils vont de bénéfices mineurs jusqu'à une nette diminution du déficit dopaminergique couplée à une amélioration significative des symptômes moteurs, 6 à 24 mois après la greffe. Toutefois, même dans les cas les plus positifs, la transplantation de neurones n'a pas encore permis l'abandon total d'un traitement médicamenteux. La survie et la croissance des cellules greffées sont liées à une série de facteurs dont l'influence n'est pas encore pleinement connue (mode de préparation des cellules souches, critères de sélection des patients susceptibles d'être greffés, maîtrise de la réponse immunitaire de l'hôte, emplacement de l'implantation du greffon…) (Bjorklund 2000; Bjorklund *et al.* 2003). Il existe aussi encore de nombreuses limites d'ordre pratique (problème de « rendement » car seuls 5 à 20% des neurones transplantés survivent) et éthique (disponibilité en tissus fœtaux d'origine humaine) (Bjorklund 2000).

D'autres sources de cellules sont donc à l'étude, comme les cellules souches embryonnaires issues de blastocystes. Elles sont pluripotentes et capables d'auto-renouvellement, ce qui constitue leur principal avantage puisqu'un stock important de cellules peut être généré à partir d'un nombre restreint d'embryons. Cependant, l'utilisation des cellules souches nécessite de parfaitement maitriser leur différenciation en neurones dopaminergiques ainsi que leur capacité proliférative (problème de tumorigénicité) (Meyer *et al.* 2010). De façon encore très prospective, d'autres sources de cellules sont envisagées, comme les cellules souches neurales issues des zones neurogéniques situées dans le cerveau humain adulte (gyrus dentelé de l'hippocampe et région sous ventriculaire) qui permettraient des greffes autologues (Arias-Carrion *et al.* 2009). De telles greffes pourraient aussi être rendues possibles dans le futur par la génération de cellules souches à partir de cellules somatiques de l'hôte : cette technique consisterait à dédifférencier puis à reprogrammer par génie génétique des fibroblastes adultes afin qu'ils acquièrent des caractéristiques neuronales et la capacité de synthétiser de la dopamine. Mais ces techniques de thérapie génique impliquent l'expression d'oncogènes putatifs *via* l'utilisation de vecteurs rétroviraux, pouvant potentiellement s'intégrer dans le génome de l'hôte et être à l'origine de cancers (Meyer *et al.* 2010). Par ailleurs, l'utilisation de cellules humaines pourrait être contournée par la mise en place de xénogreffes de cellules fœtales d'origine porcine. Des premiers essais ont été réalisés aux Etats-Unis chez des patients parkinsoniens (Schumacher *et al.* 2000). Mais cette stratégie soulève encore beaucoup d'interrogation quant aux capacités fonctionnelles du greffon et quant aux risques d'infection zoonotique ou de rejets du greffon (Bjorklund *et al.* 2003).

b) La démence à corps de Lewy

La démence à corps de Lewy est la deuxième cause de démence neurodégénérative après la Maladie d'Alzheimer. Elle représente environ 26% des cas de démences chez le sujet âgé (Barker *et al.* 2002). La maladie touche plus d'hommes que de femmes et principalement des personnes de plus de 70 ans. Le diagnostic clinique de la démence à corps de Lewy mérite d'être porté, surtout de façon différentielle par rapport à la maladie d'Alzheimer car elle a une évolution et une prise en charge qui lui sont spécifiques.

Diagnostic des démences à corps de Lewy

Les caractéristiques majeures requises pour le diagnostic clinique des démences à corps de Lewy sont :

- Des fluctuations de l'état cognitif d'amplitude suffisante pour interférer avec un fonctionnement normal social ou professionnel, avec des variations franches de l'attention et de la vigilance,
- Des hallucinations visuelles récidivantes, typiquement très précises et détaillées,
- Un syndrome parkinsonien (rigidité, bradykinésie).

A ces caractéristiques majeures peuvent être associées des caractéristiques secondaires, comme des troubles comportementaux pendant le sommeil paradoxal, des chutes fréquentes, des syncopes, des pertes de connaissance brèves, des idées délirantes systématisées, des hallucinations ou encore un état dépressif. Le fait que les manifestations cliniques des démences à corps de Lewy soient fluctuantes et très variées (association de troubles psychiatriques à des troubles neurologiques) et qu'il n'existe pas de méthodes fiables et objectives pour évaluer ces caractéristiques, rend leur diagnostic clinique difficile. De plus, l'association fréquente de la démence à corps de Lewy avec d'autres pathologies comme la maladie d'Alzheimer et la démence vasculaire ne facilite pas sa distinction clinique *(McKeith et al. 2005)*.

Le diagnostic de certitude d'une démence à corps de Lewy repose sur l'identification *post-mortem* de corps de Lewy, qui sont les lésions cérébrales neuropathologiques caractéristiques de ce type de démence. L'identification des corps de Lewy est réalisée en immunohistochimie *via* un immunomarquage de l'α-synucléine sur des coupes de cerveaux. Les corps de Lewy sont essentiellement présents dans le tronc cérébral, généralement sous forme d'inclusions intracytoplasmiques au niveau des neurones de la substance noire et du *locus coeruleus*. Ils présentent un cœur dense, très éosinophile, et sont entourés d'un halo clair. Au niveau du néocortex, les corps de Lewy ont un aspect différent : ils apparaissent comme étant moins bien circonscrits, sans halo. Enfin, les cortex limbiques et paralimbiques sont également des régions d'intérêt pour la recherche des corps de Lewy dans le diagnostic pathologique des démences à corps

de Lewy. Si la présence de corps de Lewy est le seul élément neuropathologique indispensable au diagnostic de certitude des démences à corps de Lewy, d'autres lésions cérébrales peuvent y être fréquemment associées comme :

- des neurites de Lewy, qui sont des agrégats filamenteux d'α-synucléine présents au niveau des dendrites et des axones,
- des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires corticales (très fréquentes également dans la maladie d'Alzheimer),
- une perte neuronale (notamment dans le noyau basal de Meynert, la substance noire et le *locus coeruleus*),
- une perte synaptique,
- une microvacuolisation spongiforme au niveau du cortex temporal (comparable à celle de la maladie de Creutzfeldt-Jakob).

Traitement des démences à corps de Lewy

La démence à corps de Lewy n'est pas curable : à ce jour, aucun médicament n'a fait l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché. Le déficit cholinergique existant dans la démence à corps de Lewy est plus marqué et précoce que dans la maladie d'Alzheimer. Il peut être traité par des anticholinestérasiques, qui permettent une amélioration des symptômes cognitifs et psychocomportementaux. Toutefois, de tels traitements peuvent aussi déclencher une aggravation des symptômes parkinsoniens. Les troubles moteurs peuvent être limités par l'utilisation de Lévodopa, qui doit être administrée à la dose minimum requise pour éviter d'exacerber les symptômes psychiatriques. De plus, la survenue d'un syndrome dépressif peut être traitée grâce à des antidépresseurs de nouvelle génération, dénués d'effets anticholinergiques.

c) L'atrophie multi-systématisée

L'atrophie multi-systématisée est une maladie neurodégénérative rare combinant de façon variable un syndrome parkinsonien (lenteur, rigidité, tremblements), des signes cérébelleux (ataxie) et des atteintes du système nerveux autonome (dysautonomie). L'atrophie multisystématisée affecte les deux sexes et survient pour la majorité des cas entre 50 et 70 ans. Sa prévalence est de 1/50 000 à 1/10 000. La durée de survie moyenne des patients est d'une dizaine d'années.

Diagnostic de l'atrophie multi-systématisée

Il n'existe pas de test spécifique permettant de diagnostiquer l'atrophie multi-systématisée. Le diagnostic est donc basé sur l'observation des signes cliniques : les troubles du système urinaire (incontinence) et génital (impuissance) ainsi que les problèmes de régulation de la pression artérielle

(hypotension orthostatique) sont généralement les premières manifestations de la maladie. Puis, dans de très nombreux cas (plus de 90%), un syndrome parkinsonien se développe chez les patients. Il se traduit par une lenteur et une diminution de l'amplitude des mouvements (bradykinésie, akinésie). Des tremblements de repos apparaissent, accompagnés d'une rigidité anormale. Des signes cérébelleux sont ensuite observés chez la moitié des malades, qui développent alors des troubles de la marche et de l'équilibre, des problèmes de coordination motrice. Selon les zones cérébrales endommagées, les patients atteints d'atrophie multi-systématisée peuvent également présenter des troubles de la parole, de la déglutition et de la respiration. La distinction entre l'atrophie multi-systématisée et la maladie de Parkinson peut parfois être difficile à faire car ces deux maladies partagent de nombreux signes cliniques. C'est la précocité de l'apparition de certains troubles (comme l'hypotension orthostatique, les troubles urinaires, les problèmes d'équilibre…) qui oriente le diagnostic vers une atrophie multi-systématisée plutôt que vers une maladie de parkinson. De même, la faible réponse à un traitement à la Lévodopa permet aussi de différencier les deux maladies *(Gilman et al. 2008).*

Le diagnostic définitif des atrophies multi-systématisées requiert l'observation d'inclusions gliales cytoplasmiques, abondantes, riches en α-synucléine et largement répandues dans le système nerveux central. L'accumulation de telles inclusions dans les oligodendrocytes est couplée à des pertes neuronales dans les régions nigrostriatales et olivopontocérébelleuses.

Traitement de l'atrophie multi-systématisée

Il n'existe pour le moment aucun traitement permettant de guérir les atrophies multi-systématisées. Des traitements médicamenteux peuvent cependant être mis en place pour atténuer certains symptômes :

- l'akinésie et la rigidité peuvent être partiellement limitées par des traitements à base de Lévodopa ou d'agonistes dopaminergiques,
- les troubles urinaires peuvent être traités par des anticholinergiques qui diminuent l'hyperactivité de la vessie ou par des α-bloquants qui agissent au niveau de la tonicité des sphincters,
- l'hypotension orthostatique est régulée par des vasopresseurs comme la midodrine,
- des solutions médicamenteuses existent également pour les troubles de l'érection,
- enfin, lorsque les altérations des fonctions respiratoires ou de déglutition sont très prononcées, des interventions chirurgicales (trachéotomie, gastrotomie) peuvent être proposées aux patients.

En définitive, les synucléinopathies sont des maladies complexes autour desquelles persistent de nombreuses interrogations. Ainsi, même si des facteurs de risques environnementaux ont été mis en évidence par des études épidémiologiques, les causes de ces pathologies restent mal connues. Leur diagnostic est parfois difficile à poser et l'absence de tests *ante-mortem* basés sur la détection de biomarqueurs ne permet pas de guider les cliniciens dans leur démarche. Enfin, les lacunes dans les connaissances qui existent autour de ces maladies se traduisent surtout par le fait qu'elles restent incurables (les traitements thérapeutiques mis à la disposition des patients n'ayant actuellement qu'une efficacité partielle ou temporaire).

Afin d'appréhender les pathologies liées à l'α-synucléine et ce, malgré leur complexité, les modèles *in vitro* et *in vivo* reproduisant certains aspects de ces maladies humaines se révèlent être des outils incontournables.

II-2 Modèles *in vitro* et *in vivo* d'altérations de l'α-synucléine

Il existe deux grands types de modèles permettant de reproduire partiellement, *in vitro* ou *in vivo*, les altérations de l'α-synucléine telles qu'elles ont été caractérisées dans les pathologies humaines :

- D'une part, les modèles d'intoxication reposant sur l'administration d'agents neurotoxiques provoquant des altérations de l'α-synucléine,
- D'autre part, les modèles génétiques qui sont basés sur la surexpression des formes sauvages ou mutées du gène de l'α-synucléine.

Parfois, les techniques d'intoxication et de modification génétique sont combinées afin de potentialiser leurs effets.

Pour mimer de façon parfaite la malade de Parkinson, un modèle optimal devrait idéalement :

- Permettre une apparition progressive de déficits moteurs pouvant être traités par la Lévodopa,
- Déclencher une dégénérescence des neurones dopaminergiques de *la substantia nigra pars compacta* couplée à l'apparition de corps d'inclusion contenant de l'α-synucléine dans les neurones survivants,
- Provoquer une neurodégénérescence ainsi que la présence de corps d'inclusions dans les zones non-dopaminergiques atteintes dans la maladie de Parkinson,
- Etre disponible à la fois chez des petits animaux (comme la drosophile par exemple) afin de réaliser de nombreux essais à grande échelle et à la fois chez des mammifères

(comme les primates) pour la mise en place de tests comportementaux et pour l'analyse des processus pathogéniques.

a) Les modèles d'intoxication

Les modèles d'intoxication de la maladie de Parkinson rejoignent les constatations inhérentes aux études épidémiologiques, qui d'une part soutiennent la possibilité que des pesticides puissent être impliqués dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson (Elbaz *et al.* 2009) et qui, d'autre part, montrent que les patients parkinsoniens présentent systématiquement une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Parker *et al.* 1998).

La 6-OHDA

L'intoxication à la 6-OHDA (6-hydroxydopamine) est le plus ancien modèle de la maladie de Parkinson (Ungerstedt 1968). L'action de la 6-OHDA est ciblée sur les neurones dopaminergiques puisqu'elle n'est capable de pénétrer à l'intérieur des cellules qu'en utilisant les transporteurs spécifiques de la dopamine, dont elle est un analogue hydroxylé (Luthman *et al.* 1989). Elle s'accumule ainsi à l'intérieur des neurones dans lesquels elle induit la mort cellulaire en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et en déclenchant la production de radicaux libres (Jeon *et al.* 1995; Betarbet *et al.* 2002; Dauer *et al.* 2003).

Elle est utilisée *in vitro,* notamment sur la lignée neuroblastique SH-SY5Y, et *in vivo* essentiellement chez les rongeurs et les primates non humains (Schober 2004; Olanow *et al.* 2009a; Lopes *et al.* 2010). La 6-OHDA ne pouvant pas traverser la barrière hémato-encéphalique, elle est administrée directement par stéréotaxie dans la substance noire, le striatum (contenant les terminaisons dopaminergiques) ou le faisceau médian du télencéphale (contenant les projections dopaminergiques ascendantes). L'injection unilatérale de 6-OHDA est fréquemment utilisée car elle permet de quantifier l'étendue des lésions nigrales et le déficit moteur à l'aide de tests comportementaux, en utilisant le côté sain du cerveau comme contrôle (Perese *et al.* 1989). Les principaux avantages du modèle 6-OHDA sont d'une part, d'induire la mort des neurones dopaminergiques tout en préservant les neurones non-dopaminergiques et d'autre part, de déclencher des signes cliniques proches de la pathologie humaine (akinésie, rigidité, et parfois tremblements) (Beal 2001). Par contre, l'apparition de cette symptomatologie est brutale, contrairement au développement progressif du phénotype moteur lié à la maladie de Parkinson (Betarbet *et al.* 2002). De plus, le modèle 6-OHDA n'engendre pas la formation d'inclusions intra-cytoplasmiques de type corps de Lewy (Schober 2004) et affecte principalement la *substantia nigra* et le striatum alors que d'autres zones cérébrales sont aussi touchées dans la maladie de Parkinson (comme le bulbe olfactif, le *locus coeruleus* et le tronc cérébral) (Betarbet *et al.* 2002; Schober 2004).

Le MPTP

Le MPTP (1-methyl-4-phényl-1, 2, 3, 6, -tetrahydropyridine) est un contaminant d'un analogue synthétique de l'héroïne. Il n'est pas directement toxique, mais, comme tout composé liposoluble, il a la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique ; et c'est une fois dans le parenchyme cérébral qu'il est métabolisé en MPP+ (1-methyl-4-phénylpyridinium) dans les astrocytes. Le MPP+ est alors capté par le transporteur membranaire de la dopamine pour lequel il a une très forte affinité : il s'accumule donc préférentiellement dans les neurones dopaminergiques de la *substantia nigra* où il inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Javitch *et al.* 1984; Dauer *et al.* 2003; Schober 2004).

Le MPP+ est utilisé *in vitro*, essentiellement sur des neuroblastomes humains SH-SY5Y pour évaluer le potentiel neuroprotecteur de certaines substances, comme par exemple le chrysanthème (Kim *et al.* 2011), le polygale (Choi *et al.* 2010), ou l'ail (Rojas *et al.* 2010).

Mais le MPTP est surtout utilisé *in vivo,* chez les primates non-humains et chez les rongeurs (surtout chez la souris C57Bl/6) de façon aiguë (14 à 20 mg/kg, 4 fois par jour pendant une semaine), subaiguë (30 mg/kg/jour pendant 5 jours consécutifs) ou chronique (0.05 mg/kg, 2 à 3 fois par semaine, pendant quelques semaines voire quelques mois). Il peut être délivré par gavage ou injections stéréotaxiques, mais ce sont les voies d'administration systémique (sous-cutanée, intra-veineuse, intra-musculaire ou intra-péritonéale) qui aboutissent aux résultats les plus reproductibles (Przedborski *et al.* 2001). En interférant avec le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, le MPTP provoque l'accumulation de radicaux libres et une diminution de synthèse de l'ATP, conduisant à la mort des neurones dopaminergiques nigrostriés et à la diminution concomitante des niveaux de dopamine dans le striatum (Nicklas *et al.* 1985; Schober 2004). Le MPTP provoque aussi une neuroinflammation et une activation de la microglie. Par contre, les modèles d'intoxication au MPTP ne développent pas d'inclusions intra-cellulaires rappelant précisément les corps de Lewy (Schober 2004; Halliday *et al.* 2009). Les modèles MPTP sont les modèles de synucléinopathies les mieux caractérisés et les plus utilisés actuellement pour évaluer l'efficacité de molécules neuroprotectrices ou de candidats médicaments lors des phases pré-cliniques (Schober 2004; Jackson-Lewis *et al.* 2007; Olanow *et al.* 2009a).

La roténone

La roténone est un insecticide neurotoxique, biodégradable, d'origine organique (elle est naturellement produite par certaines plantes tropicales). Sur le plan de la réglementation, la roténone est interdite depuis 2008 par la directive européenne 91/414/CEE. Toutefois, l'avis publié le 21 août 2008 au Journal Officiel de la République Française précise qu'au cas où des alternatives en

agriculture biologique ne seraient pas disponibles, l'usage de la roténone serait autorisé sur certaines cultures jusqu'en mai 2011.

Le caractère lipophile de la roténone lui confère la capacité de traverser les membranes cellulaires. Une fois dans la cellule, elle inhibe spécifiquement le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, appelé NADH-ubiquinone oxydoréductase, provoquant une diminution de la synthèse d'ATP et une augmentation du stress oxydatif (Sherer *et al.* 2005). La roténone agit également en inhibant le protéasome (Chou *et al.* 2010).

Les modèles *in vitro* sont basés sur l'intoxication aigüe (100 nM de roténone pendant 72h (Lee *et al.* 2002b)) ou chronique (de l'ordre de 0.5 à 50 nM de roténone, 3 fois par semaine, pendant 4 à 6 semaines (Sherer *et al.* 2002)) de cellules. Les protocoles d'intoxication aiguë provoquent une inhibition complète de l'activité respiratoire mitochondriale. L'utilisation chronique et à faible dose de roténone permet une apparition plus progressive des lésions neuronales, mimant de façon plus proche le développement de la maladie de Parkinson dans laquelle la diminution de l'activité mitochondriale a été évaluée à 25% environ. Ces intoxications sont réalisées sur des cultures primaires de neurones (Chaves *et al.* 2010), sur des cultures organotypiques (Testa *et al.* 2005), sur des lignées neuroblastiques (SK-N-MC (Sherer *et al.* 2002) ou SH-SY5Y (Borland *et al.* 2008) par exemple) ou encore sur des cellules génétiquement modifiées pour surexprimer l'α-synucléine (cellules rénales de singe cos-7 transfectées avec un adénovirus recombinant par exemple (Lee *et al.* 2002b)). L'exposition des cellules à la roténone déclenche un stress oxydatif et *in fine* la mort cellulaire. Des formes insolubles et de hauts poids moléculaires de l'α-synucléine, détectables en Western-blot, apparaissent. Des études d'immunofluorescence montrent que l'α-synucléine s'accumule d'abord sous forme de petits agrégats, laissant place lorsque l'intoxication se prolonge à de larges inclusions périnucléaires, de nature fibrillaire, contenant de l'α-synucléine et de l'ubiquitine (Lee *et al.* 2002b).

In vivo, des modèles d'intoxication à la roténone par voie intra-veineuse ou sous-cutanée (2 à 3 mg/kg/jour pendant 28 à 56 jours)), développés chez le rat montrent une dégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques de la *substantia nigra* (Betarbet *et al.* 2000; Sherer *et al.* 2003). Les rats traités à la roténone développent des inclusions intra-cytoplasmiques, riches en α-synucléine et en ubiquitine, s'apparentant aux corps de Lewy. D'autres caractéristiques de la maladie de Parkinson sont également retrouvées dans ce modèle (neurites de Lewy, stress oxydatif, dépôts d'α-synucléine dans les neurones entériques, endommagement du système protéasome-ubiquitine…) (Greenamyre *et al.* 2010). En termes de comportement, les rats intoxiqués à la roténone présentent une mobilité réduite, une rigidité pouvant aller parfois jusqu'à la catalepsie (Alam *et al.* 2002). Mais la principale limite de ce modèle réside dans sa forte variabilité : en effet, sans qu'aucune raison à cela ait pu être mise en évidence, la proportion d'animaux développant un

phénotype parkinsonien ainsi que l'étendue des lésions neurologiques obtenues diffèrent entre les expérimentations (Greenamyre *et al.* 2010). Toutefois, un protocole récemment publié, basé sur l'administration par voie intrapéritonéale de roténone (2.75 à 3 mg/kg/jour jusqu'à l'apparition de signes cliniques moteurs) diluée dans un solvant particulier (le miglyol), permettrait d'améliorer de façon significative la reproductibilité des résultats obtenus chez le rat (Cannon *et al.* 2009). Par ailleurs, certaines études rapportent que la neurodégénérescence causée par la roténone ne serait pas aussi sélective qu'initialement mentionné : en effet, des zones cérébrales normalement épargnées par la maladie de Parkinson pourraient être endommagées suite à l'administration de roténone (Hoglinger *et al.* 2003).

Très peu d'articles relatent des essais d'intoxication à la roténone sur souris. Un premier article montre qu'une administration chronique de roténone (2.5 à 5 mg/kg/jour pendant 30 à 45 jours) par voie sous-cutanée à des souris conventionnelles C57Bl/6 ne permet pas d'engendrer sur les neurones dopaminergiques des lésions rappelant celles de la maladie de Parkinson (Richter *et al.* 2007). Un deuxième essai d'intoxication chronique (5 mg/kg/jour, 5 jours par semaine, pendant 1 mois et demi à 3 mois) de souris C57Bl/6 par gavage cette fois-ci, a réussi à reproduire certains aspects de la progression de la maladie de Parkinson (neuroinflammation, accumulation d'α-synucléine phosphorylée, dysfonctionnements moteurs) (Pan-Montojo *et al.* 2010). L'administration par voie orale de roténone (30 mg/kg, 5 jours par semaine soit 25 fois sur une période de 35 jours) à des souris transgéniques surexprimant la forme humaine mutée en A53T de l'α-synucléine (*cf chapitre suivant sur les modèles génétiques*) provoque une diminution de l'activité locomotrice spontanée de ces souris, couplée à une expression accrue d'α-synucléine dans le cytoplasme. Par contre, aucun changement n'est observé en ce qui concerne les niveaux de dopamine dans le cerveau ou la perte neuronale du système nigrostrié (George *et al.* 2008).

Le paraquat et le maneb

Le paraquat est un herbicide non sélectif, à action rapide, appartenant à la famille des pyridines. Sa structure chimique et son mode d'action sont proches du MPP+ : la neurotoxicité du paraquat est également liée à ses capacités à inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et à produire des radicaux libres. Son autorisation de mise sur le marché a été retirée en 2007 en France. Il reste toutefois vendu actuellement dans plus de 120 pays.

In vitro, le paraquat a la capacité d'accélérer, de façon dose-dépendante, la formation de fibrilles d'α-synucléine (Uversky *et al.* 2001c) (Manning-Bog *et al.* 2002).

In vivo, chez la souris, l'administration par voie intra-péritonéale de paraquat (5 ou 10 mg/kg, une fois par semaine pendant 3 semaines) déclenche dans la *substantia nigra pars compacta* une perte de neurones dopaminergiques ainsi que la formation d'aggrégats intra-neuronaux riches en α-

synucléine de nature fibrillaire de façon dose dépendante (Brooks *et al.* 1999; Manning-Bog *et al.* 2002). L'exposition de souris au paraquat engendre également une diminution de la densité des terminaisons nerveuses dopaminergiques dans le striatum et induit un syndrome neurologique caractérisé par une réduction de l'activité ambulatoire (Manning-Bog *et al.* 2002).

Afin d'exacerber les signes pathologiques conséquents à une exposition au paraquat, et dans le but de mimer au mieux le risque environnemental lié à l'exposition concomitante à plusieurs substances neurotoxiques, des modèles murins de co-intoxication avec le maneb ont été développés. Le maneb est un fongicide, altérant lui aussi la respiration cellulaire mais en inhibant cette fois-ci le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (coenzyme Q - cytochrome C oxydoréductase). L'exposition combinée au paraquat (5-10 mg/kg) et au maneb (15-30 mg/kg) à raison d'une dose par semaine pendant 4 semaines, provoque chez des souris conventionnelles une diminution significative de leur activité motrice, avec une atteinte spécifique du système dopaminergique nigrostrié (Thiruchelvam *et al.* 2002; Uversky 2004). Un protocole identique d'intoxication chronique au paraquat et au maneb a également été mis en place sur une lignée murine transgénique surexprimant la forme mutée en A53T de l'α-synucléine humaine (*cf chapitre suivant sur les modèles génétiques*). La surexpression du gène humain *snca* porteur d'une mutation pathologique combinée à une intoxication par des pesticides provoque une exacerbation de la pathologie liée à l'α-synucléine dans le système nerveux central de ces souris (Norris *et al.* 2007).

En définitive, le MPP+, la 6-OHDA et les substances toxiques correspondant à des produits phytosanitaires (roténone, paraquat, maneb) ont toutes un mode d'action assez proches : leur neurotoxicité s'exprime au niveau mitochondrial où elle engendre une diminution de la synthèse d'ATP et la production d'espèces réactives de l'oxygène et de radicaux libres responsables d'un stress oxydatif important (Fig. 6).

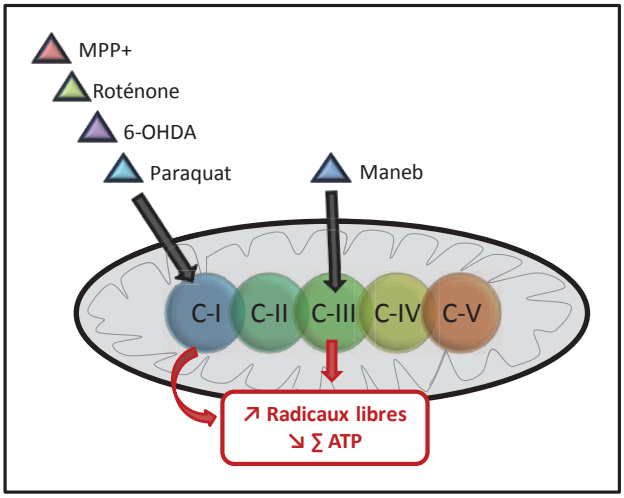


Fig. 6 : Modes d'action des neurotoxiques utilisées pour modéliser la maladie de Parkinson.
Ces composés ciblent principalement la chaîne respiratoire mitochondriale qu'ils inhibent au niveau des complexes I ou III, produisant une diminution de la synthèse d'ATP couplée à une augmentation du stress oxydatif.

Les inhibiteurs du protéasome

Face aux substances toxiques à action mitochondriale, les inhibiteurs du protéasome (comme l'époxomycine ou la lactacystine par exemple) constituent une autre stratégie pour essayer de modéliser la maladie de Parkinson.

In vitro, l'intoxication à l'aide d'inhibiteurs du protéasome de neurones (issus de la lignée PC12 provenant des glandes médullo-surrénales de rats ou de cultures primaires) engendre un défaut d'élimination des protéines mal-conformées. Ces dernières s'accumulent au sein d'inclusion riches en α-synucléine et en ubiquitine (Rideout *et al.* 2001; Macinnes *et al.* 2008).

In vivo, l'intoxication aiguë de rats *via* l'administration intrastriatale d'inhibiteurs du protéasome provoque la neurodégénérescence du système nigrostrié couplé à la formation d'inclusions intra-cytoplasmiques (Macinnes *et al.* 2008). Des premiers essais, chez le rat encore, d'exposition chronique à des inhibiteurs du protéasome semblaient prometteurs : les animaux développaient un parkinsonisme progressif (bradykinésie, rigidité, tremblement) lié à la perte de neurones dopaminergiques dans la *substantia nigra,* et couplé à l'apparition de corps d'inclusions riche en α-synucléine et en ubiquitine dans les neurones survivants (McNaught *et al.* 2004). Mais depuis, plusieurs études publiées ont prouvé le manque de robustesse de ce modèle qui s'avère être difficilement reproductible (Bove *et al.* 2006; Kordower *et al.* 2006; Manning-Bog *et al.* 2006).

En définitive, ces modèles d'intoxication sont importants pour comprendre l'implication de facteurs environnementaux dans l'étiologie de la maladie de Parkinson. Des études épidémiologiques ont en effet désigné l'exposition aux pesticides, la consommation d'eau de puits et la vie dans un milieu rural comme des facteurs de risques potientiels (Elbaz *et al.* 2009). L'influence de l'environnement a également été soulignée par le fait que la prévalence de la maladie de Parkinson entre jumeaux monozygotes et dizygotes est comparable à celle de la population générale (Marttila *et al.* 1988; Tanner 2003).

Comme précédement évoqué, des protocoles d'intoxication sont parfois envisagés sur des animaux ou des cellules modifiés pour surexprimer le gène *snca* afin d'exacerber les effets délétères des neurotoxines. L'utilisation de protocoles combinés permet parfois de générer des modèles de synucléinoapthie récapitulant de façon plus complète les caractéristiques de ces pathologies humaines.

b) Les modèles génétiques

Ces modèles de synucléinopathie, basés sur la surexpression d'α-synucléine sous sa forme sauvage ou mutée, sont inspirés des formes héréditaires de la maladie de Parkinson causées par des mutations ponctuelles ou des phénomènes de duplication/triplication du gène *snca.* Brièvement, *in vitro* comme *in vivo*, il existe essentiellement deux grandes stratégies visant à modifier génétiquement un organisme afin qu'il surexprime une forme sauvage ou mutée de l'α-synucléine:

- La construction de lignées transduites, permettant une surexpression forte mais transitoire du gène de l'α-synucléine. Cette technique est basée sur la transduction de cellules par des vecteurs viraux recombinants dans lesquels est intégré le gène *snca* sous sa forme sauvage ou mutée (Schneider *et al.* 2008),
- La construction de lignées de souris transgéniques ou de lignées de cellules transfectées, surexprimant de façon stable l'α-synucléine, suite à l'intégration dans le génome de l'animal ou de la cellule du gène *snca* précédé d'un promoteur contrôlant à la fois le niveau et le lieu d'expression du transgène (Daue*r et al.* 2003).

Les modèles animaux surexprimant l'α-synucléine par l'intermédiaire de vecteurs viraux

La surexpression de l'α-synucléine dans des cellules du cerveau qui ne sont pas en cours de division est possible grâce à l'injection, dans des zones précises ciblées par stéréotaxie, de vecteurs viraux recombinants. Cette technique a surtout été mise en place chez les primates non-humains et chez les rats. Pour cela, deux types de vecteurs sont essentiellement utilisés:

- les lentivirus (rLV – recombinant Lentiviral Vector) qui sont des dérivés du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine),
- les adénovirus (rAAV – recombinant Adeno-Associated Virus).

Chez le rat, l'injection de lentivirus porteurs du gène *snca* permet la surexpression de ce transgène dans environ 50% des neurones dopaminergiques de la substance noire. Trois à six semaines après l'injection, une accumulation progressive d'α-synucléine est observée à l'intérieur des cellules, suivie par l'apparition de neurites dystrophiques puis par la perte de 30 à 35% des neurones dopaminergiques (Deglon *et al.* 2000; Schneider *et al.* 2008).

Les adénovirus recombinants ont un tropisme pour les neurones dopaminergiques de la substance noire plus important que celui des lentivirus, puisqu'ils permettent de transduire plus de 80% de ces neurones, que ce soit chez le rat ou le singe. Chez le rat, deux à trois semaines après l'injection, l'α-synucléine commence à s'accumuler, formant ensuite de larges inclusions intra-neuronales ; puis des neurites dystrophiques apparaissent. Cinq semaines après l'injection, les rats transduits avec des adénovirus porteurs de la forme mutée en A53T de l'α-synucléine présentent une

neurodégénérescence maximale. La forme sauvage du gène *snca* provoque une perte cellulaire plus graduelle, atteignant son maximum huit semaines après l'injection. Si elle apparait de façon plus progressive, l'ampleur de cette perte neuronale est cependant identique à celle observée avec l'allèle A53T : dans les deux cas, la neurodégénérescence atteint en moyenne 50% des neurones de la *substantia nigra* (Kirik *et al.* 2002; Kirik *et al.* 2003; Maingay *et al.* 2005).

Les modèles murins transgéniques

Il existe une pluralité de modèles murins de synucléinopathies faisant intervenir diverses combinaisons de promoteurs et de transgènes, produisant toutes des phénotypes différents, plus ou moins sévères et récapitulant avec plus ou moins de fidélité les caractéristiques des maladies humaines de l'α-synucléine (Tableau 2).

Les principaux promoteurs utilisés pour contrôler l'expression du gène *snca*, sont:

- le promoteur du gène de la protéine prion (PrP), permettant une expression notamment neuronale (Giasson *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002c),
- le promoteur du gène humain du facteur de croissance dérivé des plaquettes β (hPDGF-β human Platelet Derived Growth Factor β), qui avait été précédemment utilisé avec succès pour exprimer au niveau neuronal des protéines impliquées dans d'autres maladies neurodégénératives (Masliah *et al.* 2000),
- le promoteur du gène de la tyrosine hydroxylase (TH), dans le but de faire exprimer de façon ciblée le transgène dans les neurones dopaminergiques (Matsuoka *et al.* 2001; Rathke-Hartlieb *et al.* 2001; Richfield *et al.* 2002),
- le promoteur du gène Thy1 (thymocyte antigen 1), spécifique des tissus nerveux et lymphoïdes, et qui est fréquemment utilisé pour permettre l'expression de transgène au niveau du cerveau (Kahle *et al.* 2000; van der Putten *et al.* 2000).

Si le transgène piloté par ces promoteurs correspond le plus souvent aux formes sauvages ou mutées (A53T et/ou A30P) de l'α-synucléine (Tableau 2), il existe aussi des modèles murins basés sur l'expression d'α-synucléine tronquée en C-terminale (Tofaris *et al.* 2006), cette dernière étant particulièrement encline à la formation de fibrilles.

Tableau 2 : les principaux modèles de souris transgéniques surexprimant l'α-synucléine (Fernagut *et al.* 2004; Maingay *et al.* 2005)

Gène *snca*	Promoteur	Expression	Comportement	Perte cellulaire dans SN	Niveaux De dopamine	Inclusions
WT	**hPDGF-β** (Masliah *et al.* 2000)	Cerveau	↘ performances motrices	-	↘de 50% dans les terminaisons dopaminergiques	+ α-syn, ubi mais non fibrillaires
	TH de rat (Richfield *et al.* 2002)	Cellules catécholaminergiques	-	-	-	-
	PrP murine (Giasson *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002c)	Cerveau et moëlle épinière	-	-	-	-
A53T	**Thy1 murin** (van der Putten *et al.* 2000)	Cerveau (sauf SN) et moëlle épinière	↘ activité motrice	-	-	+ α-syn, ubi
	TH de rat (Matsuoka *et al.* 2001)	Cellules catécholaminergiques	-	-	-	-
	PrP murine (Giasson *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002c)	Cerveau et moëlle épinière	Phénotype moteur sévère, paralysie train arrière	-	-	+ α-syn fibrillaire, ubi
A30P	**Thy1 murin** (Kahle *et al.* 2000; Rathke-Hartlieb *et al.* 2001)	Cerveau et moëlle épinière	-	-	-	-
	TH de rat (Matsuoka *et al.* 2001; Rathke-Hartlieb *et al.* 2001)	Cellules catécholaminergiques	-	-	-	-
	PrP murine (Lee *et al.* 2002c)	Cerveau et moëlle épinière	-	-	-	+ α-syn, ubi
A53T et A30P	**TH de rat** (Richfield *et al.* 2002)	Cellules catécholaminergiques	↘ activité motrice et coordination	-	↘ de 20 à 40% du niveau de dopamine dans le striatum	-

α-syn : α-synucléine, hPDGF-β : facteur de croissance humain dérivé des plaquettes-β, PrP : protéine prion, SN : Substance Noire, TH : Tyrosine Hydroxylase, ubi : ubiquitine, WT : Wild-Type sauvage

Parmi ces modèles murins de synucléinopathies, deux sont disponibles à l'anses : il s'agit des lignées transgéniques soulignées dans le tableau 2. Ces deux lignées, dont les caractéristiques sont détaillées dans les paragraphes ci-dessous, sont, de par leur construction et leurs phénotypes, à la fois divergentes et complémentaires.

La lignée TgD9 (Masliah *et al.* 2000)

Le modèle TgD9 est la première lignée de souris transgénique pour l'α-synucléine à avoir été générée. Elle a été créée en 2000 par l'équipe d'Eliezer Masliah du « Department of Neuroscience »

de l'Université de Californie à San Diego (Masliah *et al.* 2000). Elle est commercialisée par JSW Research.

Les souris TgD9 expriment l'α-synucléine humaine sauvage, sous le contrôle du promoteur du gène humain du facteur de croissance dérivé des plaquettes (human PDGF-β promoter). Ce promoteur permet une expression précoce du transgène conduisant à l'apparition, dès 2 mois, d'inclusions intraneuronales marquées par des anticorps anti α-synucléine humaine. Ces inclusions pouvant être nucléaires ou cytoplasmiques, sont majoritairement abondantes dans les neurones des couches profondes du néocortex, dans l'hippocampe, dans le bulbe olfactif et, occasionnellement, dans la substance noire ; c'est-à-dire dans des régions cérébrales identiques à celles atteintes dans la maladie à corps de Lewy. Un double immunomarquage de l'α-synucléine et de la tyrosine hydroxylase (intervenant dans la synthèse de dopamine) révèle que les neurones dopaminergiques de la substance noire présentent une accumulation anormale d'α-synucléine. De la même façon que dans les maladies humaines à corps de Lewy, ces inclusions d'α-synucléine sont riches en ubiquitine et apparaissent de façon concomitante à un processus neuritique ; par contre, elles ne possèdent pas la même structure que dans les pathologies humaines puisqu'elles ne sont pas de nature fibrillaire. De plus, si dans le modèle TgD9 les neurones dopaminergiques présentent des altérations de l'α-synucléine couplées à une diminution de l'activité de la tyrosine hydroxylase, aucune perte neuronale n'est observée dans la substance noire, contrairement à ce qu'il se passe dans la pathologie humaine.

D'un point de vue clinique, aucun symptôme sévère n'a pu être relié à la surexpression de l'α-synucléine humaine sauvage dans le modèle TgD9. Toutefois, cette lignée présente un déficit moteur, révélé par des tests expérimentaux visant à comparer les performances motrices de souris TgD9 âgées de 12 mois par rapport à des souris contrôles non-transgéniques du même âge.

La lignée murine TgM83 (Giasson *et al.* 2002; Sotiriou *et al.* 2009; Waxman *et al.* 2009a)

Le modèle TgM83 surexprime l'α-synucléine humaine mutée en A53T sous le contrôle du promoteur de la protéine prion. Ce modèle a été produit en 2002 par l'équipe de Virginia Lee et Benoît Giasson au « Center for Neurodegenerative Disease Research » de l'Université de Pennsylvanie (Giasson *et al.* 2002) ; il est commercialisé par The Jackson Laboratory [B6 ; C3-Tg(Prnp-SNCA*A53T)83Vle/J]. Cette lignée a été obtenue par transgénèse classique *via* la microinjection d'ADN dans le noyau d'un embryon de souris B6C3H au stade unicellulaire. Les souris TgM83 expriment (en plus du transgène qu'elles portent), l'α-synucléine murine endogène puisque la transgénèse n'a pas été réalisée sur des animaux ayant un fond génétique knock-out pour le gène *snca*.

De façon absolue, le transgène est exprimé à un niveau comparable dans le cortex, le cervelet et la moelle épinière (données obtenues par Western-blot quantitatif). Par rapport au niveau endogène d'expression du gène murin, le transgène est exprimé 4.6 fois plus dans le cortex et 28.2 fois plus dans la moelle épinière. Ces niveaux d'expression relatifs sont liés au fait que l'α-synucléine endogène est moins exprimée dans la moelle épinière que dans le cortex.

Entre 8 et 16 mois selon Benoît Giasson (et entre 10 et 22 mois selon nos propres observations), les souris homozygotes TgM83 développent un phénotype moteur sévère caractérisé par une perte de poids, une diminution de la mobilité couplée à des difficultés de locomotion, une raideur du train postérieur et de la queue évoluant en paralysie complète. Les souris deviennent alors incapables de se retourner lorsqu'elles sont mises sur le dos (Fig. 7). L'évolution de ces signes cliniques est très rapide : il se passe quelques jours seulement en moyenne entre l'apparition des premiers symptômes et le moment où les souris sont euthanasiées puisqu'elles deviennent incapables de se nourrir.

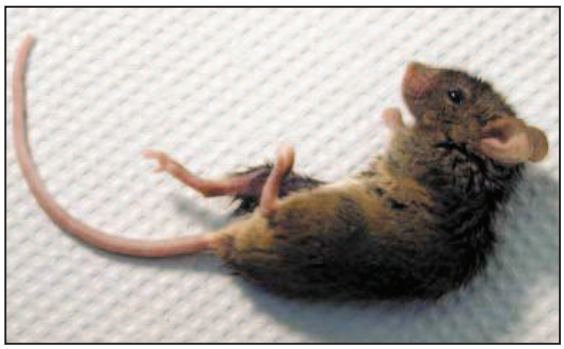


Fig. 7 : Souris TgM83 âgée de 11 mois, présentant des signes cliniques moteurs aigus liés à une pathologie de l'α-synucléine (Giasson *et al.* 2002)

La présence de signes cliniques moteurs est systématiquement corrélée avec celle d'agrégats intra-cellulaires d'α-synucléine : l'analyse immunohistochimique des cerveaux de souris TgM83 ayant développé des signes cliniques révèle la présence d'inclusions composées d'α-synucléine filamenteuse et d'ubiquitine dans les compartiments somatodendritiques. La morphologie de ces inclusions diffère de celle des corps de Lewy caractéristiques de la maladie de Parkinson : en effet, dans le modèle TgM83, la majorité des lésions liées à l'α-synucléine remplissent intégralement le compartiment somatodendritique et ne se présentent pas sous forme d'agrégats punctiformes comme les corps de Lewy (Fig. 8). Ces inclusions sont particulièrement denses dans la moelle épinière, le tronc cérébral, le cervelet et quelques régions du thalamus. Les animaux symptomatiques présentent aussi des neurites dystrophiques, surtout dans la partie dorsolatérale du striatum et en moindre mesure dans le cortex moteur. Par contre, les autres zones corticales, le bulbe olfactif et l'hippocampe sont dépourvus de pathologie liée à l'α-synucléine (Fig. 8). Certaines populations

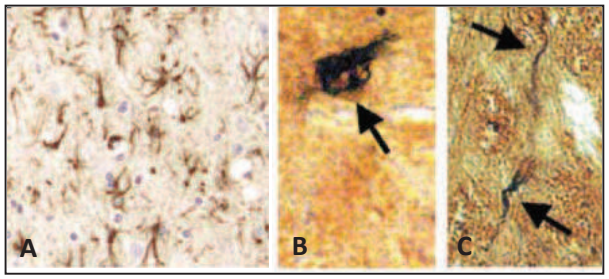


Fig. 8 : Analyse immunohistochimique de la moëlle épinière d'une souris TgM83 morte avec des signes cliniques (Giasson *et al.* 2002). **A** : Astrogliose réactionnelle révélée par immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-GFAP ; **B** : Inclusions d'α-synucléine marquée par un anticorps anti α-synucléine ; **C** : Neurites dystrophiques détectés par un anticorps anti α-synucléine

cellulaires particulièrement atteintes dans la maladie de Parkinson, comme les neurones dopaminergiques de la substance noire, sont épargnées par la synucléinopathie se développant dans le modèle TgM83. D'une manière générale, le système noradrénergique des souris TgM83 semble plus vulnérable que le système dopaminergique aux effets toxiques provoqués par la surexpression de l'α-synucléine humaine mutée en A53T (Sotiriou *et al.* 2009). L'analyse immunohistochimique des cerveaux de souris TgM83 symptomatiques révèle aussi une gliose astrocytaire, cohérente avec l'atteinte neuronale précédemment décrite (Fig. 8).

Dans ce modèle, l'apparition de signes cliniques est également corrélée à celle d'altérations moléculaires de l'α-synucléine : l'analyse en Western-blot d'homogénats de cerveaux de TgM83 symptomatiques montre la présence de formes insolubles dans les détergents et/ou agrégées (présence de plusieurs espèces de hauts poids moléculaires) (Fig. 9). Ces formes altérées de l'α-synucléine sont détectées en abondance dans la moelle épinière et le cervelet, ainsi qu'en moindre mesure dans le cortex.

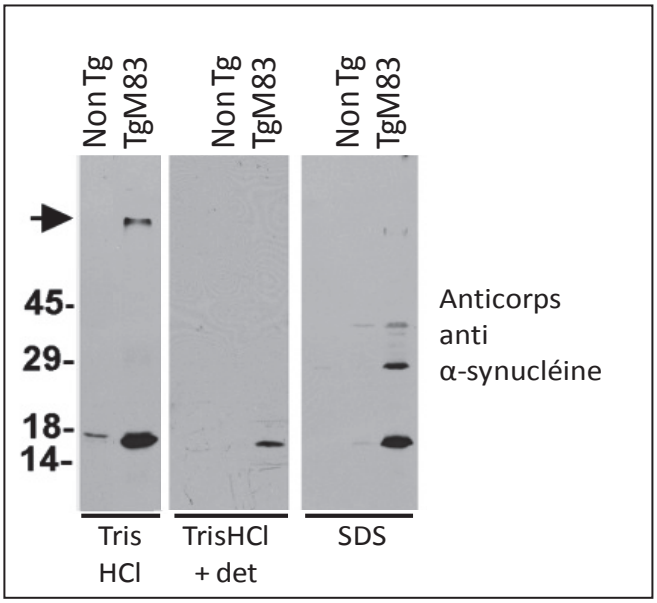


Fig. 9 : Western-blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant les α-synucléines humaines et murines d'homogénats de moelles épinières issues de souris non transgéniques (non Tg) et de souris TgM83 ayant développé des signes cliniques (Giasson *et al.* 2002)

La totalité de l'α-synucléine murine extraite des souris non Tg est solubilisée en tampon Tris HCl. Une partie de l'α-synucléine issue des souris TgM83 nécessite l'addition de détergent au tampon Tris HCl (TrisHCl + det) pour être solubilisée. Ces souris possèdent aussi de l'α-synucléine insoluble dans les détergents (et soluble dans le dodécylsulfate de sodium (fraction SDS)). Des formes agrégées de hauts poids moléculaires solubles (fraction TrisHCl) ou insolubles (fraction SDS) peuvent être extraites des TgM83 symptomatiques

Par conséquent, la lignée TgM83 surexprimant le gène humain de l'α-synucléine muté en A53T présente des similitudes importantes avec les synucléinopathies humaines, notamment avec la forme héréditaire de maladie de Parkinson. Chez l'homme, la mutation A53T est corrélée à une apparition précoce des signes parkinsoniens (environ vers 45 ans) et à une distribution des lésions liées à l'α-synucléine plus étendue à travers le système nerveux central que dans la forme idiopathique de la maladie. Dans le modèle TgM83, l'expression neuronale du trangène sous le contrôle du promoteur du gène de la protéine prion permet l'apparition de signes cliniques moteurs à un âge moyen, voire tardif chez la souris, coïncidant avec l'accumulation d'inclusions intracellulaires composées de filaments d'α-synucléine (10-15 nm) réparties de façon éparse dans le système nerveux central. Aussi, les caractéristiques biochimiques (insolubilité, phosphorylation, formes de haut poids moléculaires) des formes pathologiques de l'α-synucléine extraites des souris TgM83 symptomatiques sont similaires à celles purifiées à partir de cerveaux de patients parkinsoniens. De même, dans la pathologie des TgM83 a été mises en évidence une gliose astrocytaire ainsi que des atteintes des systèmes mitochondriaux et vésiculaires, comme dans la maladie humaine.

Toutefois, il existe aussi des points de divergence entre le modèle murin TgM83 et les synucléinopathies. Ainsi, bien qu'il existe des homologies, la localisation des lésions chez la souris TgM83 n'est pas en tous points similaires aux maladies humaines: en effet, la pathologie liée à l'α-synucléine dans le cerveau des TgM83 est abondante dans le tronc cérébral, le *locus coeruleus*, le noyau du raphe, comme dans la maladie de Parkinson et les démences à corps de Lewy. Il existe aussi une pathologie striatale chez la souris transgénique comme chez l'homme. Par contre, il n'existe pas de pathologie particulièrement notoire chez les TgM83 dans les neurones dopaminergiques de la substance noire. Ainsi, dans ce modèle murin, les effets délétères des formes toxiques de l'α-synucléine seraient prépondérants dans le système noradrénergique, alors que le système dopaminergique serait majoritairement épargné. Cette différence peut être expliquée par des divergences neuroanatomiques interspécifiques (neuromélatonine moins abondante chez les souris, mécanismes murins de protection au stress oxydatif différents). Ainsi, contrairement à la pathologie humaine, la cause principale du phénotype moteur développé par les TgM83 serait vraisemblablement la dégénérescence des axones des motoneurones dans la moelle épinière.

Une étude récente, ayant pour but d'étudier les effets combinés des altérations pathologiques de l'α-synucléine et des phénomènes neuroinflammatoires, a abouti à une amélioration du modèle TgM83. En effet, l'administration par voie intrapéritonéale de lipopolysaccharide aux souris TgM83 provoque une neuroinflammation persistente couplée à une neurodégénérescence progressive et relativement sélective de la voie dopaminergique

nigrostriatale : les neurones dopaminergiques de la substance noire présentent des corps d'inclusions dont la composition riche en α-synucléine aggrégée, rappelle celle des corps de Lewy (Gao *et al.* 2011).

Par ailleurs, il existe d'autres modèles murins basés sur l'expression d'α-synucléine humaine mutée en A53T sous le contrôle du promoteur du gène de la protéine prion (Lee *et al.* 2002c; Li *et al.* 2004). Ces lignées étant produites par transgénèse classique, elles diffèrent les unes des autres par la localisation du transgène, celui-ci s'insérant dans le génome de l'hôte de façon aléatoire.

Quelques modèles animaux non-murins

En plus des modèles murins, il existe des modèles transgéniques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, chez *Caenorhabditis elegans* et chez *Drosophila melanogaster* (Waxman *et al.* 2009a). La particularité de ces modèles réside dans le fait qu'ils n'expriment pas de façon endogène l'α-synucléine.

Chez la levure, l'expression de l'α-synucléine est couplée à la formation de corps d'inclusion, à la perturbation du trafic vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, ainsi qu'à une certaine toxicité s'exprimant par l'inhibition de la croissance cellulaire voire par la mort de la levure (Outeiro *et al.* 2003; Soper *et al.* 2008).

L'expression d'α-synucléine humaine chez la drosophile conduirait, au cours de son vieillissement, à l'apparition de corps d'inclusions riches en α-synucléine filamenteuse, au développement de difficultés locomotrices, puis à la perte des neurones dopaminergiques (Feany *et al.* 2000). Toutefois, ces résultats n'ont pu être reproduits que partiellement par la suite (Pesah *et al.* 2005).

Les résultats obtenus chez le vers *C. elegans* prêtent aussi à controverse. S'il ne reste pas certain que la surexpression d'α-synucléine engendre la mort des neurones dopaminergiques, il est par contre avéré que celle-ci provoque une diminution du niveau de dopamine associée à un déficit locomoteur (Kuwahara *et al.* 2006).

En définitive, depuis une vingtaine d'année, la compréhension de la maladie de Parkinson a progressé essentiellement grâce à deux grands axes que sont, d'une part la découverte des gènes impliqués dans les formes héréditaires de la maladie, et d'autre part la mise en évidence d'une neurotoxicité induite par l'exposition à des agents issus de l'environnement, comme les pesticides. La découverte de ces deux familles de facteurs pouvant être à l'origine d'altérations de l'α-synucléine a permis d'induire, dans des cellules ou des animaux, certaines lésions caractéristiques des synucléinopathies. Ces modèles *in vitro* et *in vivo* sont utilisés pour étudier la pathogénèse des

maladies neurodégénératives et pour évaluer l'efficacité de candidats thérapeutiques. Toutefois, ces modèles ne reproduisant que partiellement la pathologie humaine, il est essentiel de bien connaitre leurs caractéristiques, leurs contraintes et leurs limites, afin de choisir le modèle le mieux approprié aux phénomènes que l'on souhaite étudier. Par exemple, l'avantage principal de l'utilisation des vecteurs viraux chez les animaux réside dans le fait qu'ils permettent de cibler la surexpression de l'α-synucléine dans des régions cérébrales, spécifiquement vulnérables dans la maladie de Parkinson. Cette technique génère ainsi des modèles caractérisés par l'apparition d'inclusions riches en α-synucléine, associée à la perte progressive et sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire. Mais, ces modèles sont lourds à mettre en œuvre (injection stéréotaxique à pratiquer sur chaque animal) et n'expriment le transgène que de façon transitoire. A l'inverse, si les modèles murins transgéniques sont fastidieux à développer, ils offrent ensuite la possibilité de générer des lots d'animaux homogènes et en nombre relativement conséquent. Certaines lignées transgéniques permettent de reproduire des inclusions riches en α-synucléine, rappelant les corps de Lewy. Une symptomatologie motrice peut aussi apparaître, de façon corrélée à l'apparition d'altérations de l'α-synucléine. Mais, contrairement aux modèles basés sur les vecteurs viraux, les signes cliniques observés chez les souris transgéniques ne sont jamais dus à la dégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques de la substance noire, mais à la perte de motoneurones, ce qui constitue une divergence importante par rapport à la maladie de Parkinson.

III. Les maladies à prion – Liens éventuels avec les pathologies de l'α-synucléine

III-1 Le prion et les ESST

Les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST) sont des maladies neurodégénératives, systématiquement fatales, causées par des agents pathologiques atypiques. Le caractère inhabituel de ces derniers, nommés ATNC pour Agents Transmissibles Non Conventionnels, a été révélé par le fait qu'ils possèdent des propriétés de résistance aux procédés classiques d'inactivation des microorganismes : en effet, les ATNC sont insensibles aux traitements physiques (chaleur, rayonnements ionisants), chimiques (acides forts, aldéhydes de type formol) et aux procédés visant à dégrader les acides nucléiques (ribonucléase, désoxyribonucléase). Seules les méthodes dénaturant les protéines (protéases, urée) ont la capacité de diminuer leur titre infectieux. Ainsi, selon l'hypothèse la plus communément admise, les ESST seraient causées par des agents infectieux de nature protéique, baptisés prion pour « proteinaceous infectious particle » (Prusiner 1982). Les protéines prion sont des protéines endogènes, présentes de façon physiologique à la surface de nombreux types cellulaires, et capables de se transconformer pour donner naissance à leur isoforme pathologique, nommée PrPd pour « disease-associated prion protein ». La PrPd constitue à ce jour l'unique marqueur moléculaire spécifique des ESST.

a) Généralités sur la protéine prion

La forme normale de la protéine prion (PrPc pour protéine prion cellulaire) et son conformère pathologique (PrPd) possèdent la même structure primaire (Turk *et al.* 1988). Elles sont toutes les deux les produits du gène *prnp,* localisé chez l'homme sur le chromosome 20 (Sparkes *et al.* 1986). L'expression du gène *prnp* est précoce (chez la souris, des ARNm sont présents dans le système nerveux central dès le 12ème jour du développement embryonnaire (Manson *et al.* 1992)) et ubiquiste. C'est dans le système nerveux central et notamment dans les neurones du septum, du thalamus, de l'hippocampe et dans les cellules de Purkinje du cervelet que la protéine prion est la plus fortement exprimée (Moya *et al.* 2000). Des études chez le mouton ont montré qu'elle est aussi présente au niveau périphérique dans la rate, les muscles, les poumons, le cœur, l'utérus, les ganglions lymphatiques, les épithéliums sécrétoires de l'intestin et de l'estomac, et dans les glandes mammaires, surrénales et parotidiennes (Horiuchi *et al.* 1995).

La séquence du gène *prnp* est hautement conservée chez tous les mammifères (entre 80 à 90% d'homologie) (Westaway *et al.* 1986) : une forte pression de sélection s'exerce donc en faveur de son maintien, laissant penser que la fonction physiologique de la protéine prion doit être essentielle au sein du système nerveux. Or, des essais d'invalidation du gène *prnp* par recombinaison homologue (Bueler *et al.* 1992; Manson *et al.* 1994) n'ont donné lieu qu'à des anomalies neurophysiologiques mineures, en relation avec l'excitabilité neuronale et la régulation du cycle circadien (Raeber *et al.* 1998). Si les fonctions physiologiques de la protéine prion restent mal connues, des hypothèses mentionnent le fait qu'elle pourrait entre autres jouer un rôle dans la l'immunorégulation, dans la fixation du cuivre, dans la transmission synaptique ou dans la modulation de la cascade moléculaire conduisant à l'apoptose (Aguzzi *et al.* 2008).

L'ARNm du gène *prnp* donne lieu à un précurseur de 254 acides aminés subissant ensuite des modifications post-traductionnelles (Fig. 10):

- Clivage de la séquence signal N-terminale (acides aminés 1 à 22),
- Clivage de la partie hydrophobe C-terminale (acides aminés 231 à 253) et addition d'un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) sur le résidu asparagine en position 231 permettant l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique,
- Formation d'un pont disulfure entre les résidus cystéines en positions 178 et 213,
- Addition éventuelle dans l'appareil de Golgi d'un, voire deux, groupements oligosaccharidiques sur les résidus asparagine en positions 181 et 197, permettant l'obtention de formes mono-, bi- ou non-glycosylées (Endo *et al.* 1989; Riesner 2003). Selon le taux de glucide associé, le poids moléculaire de la protéine prion varie entre 26 et 34 kDa.

Dans son domaine amino-terminal, entre les positions 51 et 90, la protéine prion contient une séquence d'octapeptides [Proline – Histidine – Glycine – Glycine – Glycine - Tryptophane – Glycine – Glutamine] répétée et extrêmement conservée. Une autre zone particulière de la protéine est également très conservée chez les mammifères : il s'agit d'une région hydrophobe entre les acides-aminés 111 et 134, qui est impliquée dans la formation d'un éventuel domaine transmembranaire.

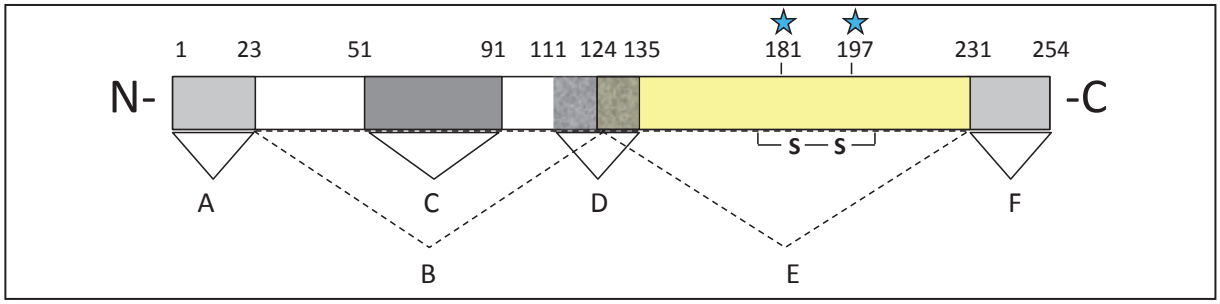


Fig. 10 : La structure primaire de la protéine prion humaine (254 acides aminés)
A. Séquence signal N-terminale (1-22), **B**. Domaine N-terminal (23-123), **C.** Région des octapeptides répétés (51-90), **D.** Région hydrophobe conservée correspondant au domaine transmembranaire (111-134), **E**. Domaine central hydrophobe très conservé (124-230), **F.** Domaine C-terminal tronqué lors de l'addition de l'ancre GPI (231-254), ★ Résidus asparagine permettant la fixation d'une chaîne oligosaccharidique, **-S-S-.** Pont disulfure (178 et 213)

La protéine prion peut se trouver sous différentes formes typologiques (Hegde *et al.* 1998) (Fig. 11):

- Elle est majoritairement secrétée et fixée à la membrane plasmique par son ancre GPI (Stahl *et al.* 1987). Il existe deux formes de protéines prion secrétées (PrPsec), appelées fragments C1 et C2, de 18 et 21 kDa respectivement, qui sont issues de clivages physiologiques aux acides aminés 90 et 110/111 (Mange *et al.* 2004; Owen *et al.* 2007). La PrPsec peut aussi être libérée dans le milieu extracellulaire (Parizek *et al.* 2001),
- La protéine prion existe également sous deux autres formes, dites transmembranaires. La première, dénommée PrPCtm, est fixée comme la forme secrétée à la membrane *via* l'ancre glypiée, mais présente la particularité de conserver son peptide signal amino-terminal, lequel est retenu à l'intérieur de la cellule, dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (Stewart *et al.* 2001). La seconde, appelée PrPNtm, présente une orientation inverse par rapport à la forme PrPCtm (son extrémité N-terminale est extracellulaire alors que la C-terminale est intracellulaire). De plus, elle est ni glycosylée, ni glypiée et a été décrite uniquement *in vitro* (Hegde *et al.* 1998).

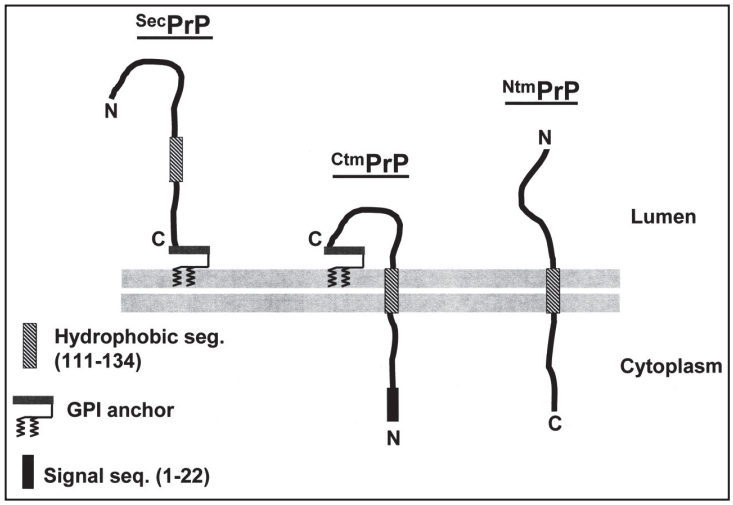


Fig. 11 : Les différentes topologies de la protéine prion (Harris 2003)
PrPsec : forme secrétée dans le milieu extrcellulaire et fixée à la membrane plasmique via l'ancre GPI, **PrPCtm** : forme transmembranaire fixée à la membrane plasmique via l'ancre GPI et ayant conservé son peptide signal (1-22) en intracellulaire, **PrPNtm** : forme transmembranaire non glypiée, dont la partie N-terminale est extracellulaire alors que la partie N-terminale est intracytoplasmique

En conditions physiologiques, la PrPsec qui se trouve à la surface de la cellule, fait l'objet d'un processus continu d'endocytose. Après un passage *via* les endosomes, une partie des PrPsec est recyclée et à nouveau adressée à la surface de la membrane, alors que l'autre partie est dirigée vers le lysosome où elle est dégradée. Les protéines prion transmembranaires sont éliminées par le protéasome, comme les protéines malformées solubles. Les formes insolubles de la protéine prion, rares en situation physiologique, sont quant à elles prises en charge par le système endo-lysosomal (Beranger *et al.* 2003).

b) De la PrPc à la PrPd

Trois hypothèses concernant la nature exacte des agents infectieux responsables des ESST ont encore cours :

- L'hypothèse virale soutient le fait que l'agent infectieux serait un virus qui se fixerait sur la protéine prion, laquelle aurait alors un rôle secondaire de récepteur (Manuelidis 2004) (cette hypothèse est appuyée par l'existence de rapports étroits entre protéine prion et acides nucléiques),
- L'hypothèse de la protéine seule, qui est celle la plus largement admise, décrit l'isoforme pathologique de la protéine prion, désignée par l'acronyme PrPd, comme l'unique agent infectieux (Prusiner 1982). Cette hypothèse est renforcée par les observations suivantes : (i) la PrPd est le constituant principal des fractions infectieuses induisant une ESST, (ii) les souris knock-out pour le gène *prnp* sont résistantes aux ESST et (iii) la PrPd peut être produite *de novo* par transconformation *in vitro* de la PrPc,
- L'hypothèse intermédiaire de l'holoprion où l'agent infectieux serait constitué par l'association de protéines prion pathologiques avec des acides nucléiques (Weissmann 1991).

Selon l'hypothèse de la protéine seule, la conversion de la protéine prion normale PrPc en protéine prion pathologique PrPd pourrait se faire selon deux modèles (Aguzzi *et al.* 2004) (Fig. 12):

- Le modèle du remaniement imposé par la matrice (template-directed refolding) où lors d'une infection, la PrPd exogène initie la transconformation des PrPc de l'hôte en PrPd *via* la formation d'hétérodimères,
- Le modèle de la nucléation (seeded-nucleation) qui débute par une étape lente et critique au cours de laquelle les monomères de PrPc sont transformés en PrPd formant alors un noyau appelé « seed » à partir duquel un mécanisme de polymérisation rapide est initié.

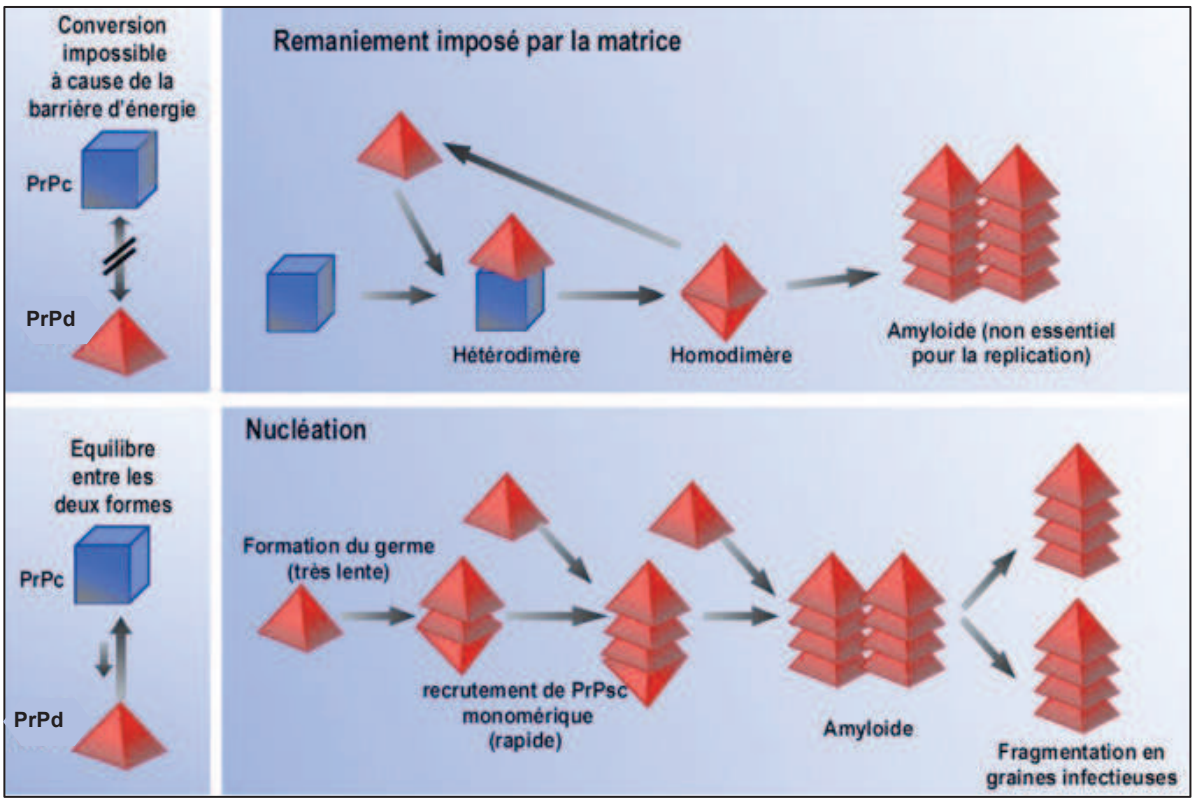


Fig. 12 : Modèles hypothétiques de la conversion conformationnelle de la PrPc en PrPd (Aguzzi *et al.* 2004)

Si PrPc et PrPd ont la même séquence primaire, elles possèdent des structures d'ordre supérieur différentes, qui leur confèrent des propriétés biochimiques divergentes. La structure tridimensionnelle de la PrPc comprendrait un domaine N-terminal flexible (acides aminés 23 à 128) ainsi qu'un cœur composé de trois hélices α et d'un feuillet β fait de deux brins antiparallèles (Aguzzi *et al.* 2008) (Fig. 13). Ainsi, la PrPc contient une majorité d'hélice α (42%) et très peu de feuillets β (3%) alors que son conformère pathologique comporte des taux d'hélices α (30%) et de feuillets β (43%) proches (Pan *et al.* 1993) (Fig. 13). La transconformation de la PrPc en PrPd, correspondant à une transition d'hélices α en feuillets β, serait couplée à l'acquisition des propriétés biochimiques particulières de la PrPd (capacité à s'agréger, résistance partielle à la protéinase K et solubilité faible, voire nulle, dans les détergents). L'agencement spatial des protéines prion pathologiques serait aussi à l'origine des variations du pouvoir infectieux des différentes souches de prion (Tixador *et al.* 2010).

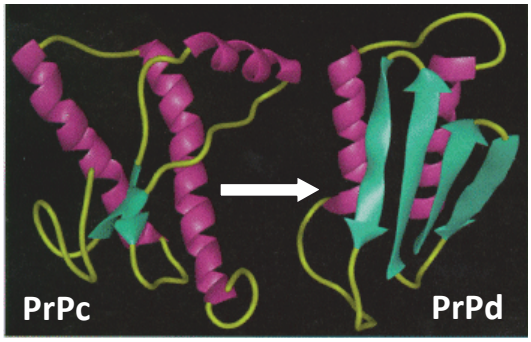


Fig. 13 : Structures secondaires de la PrPc et de la PrPd
La structure tridimensionnelle de la PrPc comporte une prédominance d'hélices α (en rose) alors que les taux d'hélices α et de feuillets β (en vert) dans la PrPd sont proches l'un de l'autre
Image issue du site http://www. scienceblogs.com

c) Pathogénicité des protéines prion

Généralement, les ESST peuvent être définies comme des maladies infectieuses, se caractérisant par un processus neurotoxique responsable de l'apparition de lésions spongiformes dans le cerveau et associé à l'accumulation de PrPd détectable par des techniques biochimiques ou immunohistochimiques. Toutefois, cette définition doit être modulée car les caractères infectieux et toxiques du prion, ainsi que présence de PrPd détectable ne sont parfois pas corrélés, par exemple:

- Au cours du développement des ESST, si la PrPd se propage d'abord au niveau des organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques), elle n'y cause pas de lésions particulières (Clarke *et al.* 1971) ; c'est uniquement suite à la phase de neuro-invasion que la toxicité des maladies à prion s'exprime au niveau du système nerveux central (Aguzzi 2001; Aucouturier *et al.* 2001),
- De même, il a été décrit que certaines lignées de cellules sont capables de propager une infection (c'est à dire de transmettre la PrPd) sans qu'il y ait déclenchement de la mort cellulaire (Chesebro et al. 1993; Vilette et al. 2001),
- De plus, dans certains cas d'une maladie à prion humaine génétique (Gerstmann-Sträussler-Scheinker P102L), une accumulation de PrPd peut être observée en absence de neurodégénérescence spongiforme. Les essais d'inoculation de ces cas de maladie à prion à des souris transgéniques humaines ont reproduit l'apparition de dépôts de PrPd sans qu'une maladie neurologique ne se déclare (Piccardo *et al.* 2007),
- A l'inverse, des essais de transmission d'encéphalopathie spongiforme bovine à des souris ont montré que si la totalité des animaux inoculés développait des symptômes neurologiques couplés à une mort neuronale, moins de la moitié d'entre eux présentait une accumulation de protéine prion résistante aux protéases (Lasmezas *et al.* 1997),
- De la même manière, des modèles murins transgéniques exprimant une protéine prion modifiée peuvent développer une maladie neurodégénérative sans qu'il ne soit possible de détecter la présence de PrPd (Hegde et al. 1999; Chiesa et al. 2003).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en place au cours de l'infection et responsables de la mort neuronale, de la vacuolisation des neurones survivants, de la multiplication astrocytaire et de l'activation de la microglie ne sont toujours pas connus précisément. Une première hypothèse suggère une toxicité directe de certaines espèces de PrPd (agrégats fibrillaires ou petits oligomères). Une autre hypothèse propose que ce soit le changement de conformation de la protéine prion qui conduirait à un gain de fonctions délétères (inhibition du protéasome, induction de l'apoptose, perturbation de la division cellulaire…), *via* des interactions spécifiques entre la PrPd et d'autres partenaires (Hetz *et al.* 2003).

d) Les différentes formes d'ESST

Les ESST sont des amyloses neurodégénératives qui se caractérisent par une longue période d'incubation asymptomatique suivie par une maladie neurologique d'évolution subaigüe, systématiquement létale en quelques semaines à quelques mois.

Chez l'homme, l'ESST la plus connue est la maladie de Creutzfeldt-Jakob, qui se traduit par des troubles du comportement, des troubles visuels, des mouvements anormaux involontaires, des tremblements, des vertiges, des difficultés d'élocution et des déficits cognitifs et une confusion mentale évoluant en démence.

L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou « maladie de la vache folle » a été identifiée au Royaume-Uni en 1986 chez une vache présentant des signes neurologiques atypiques (troubles du comportement, hyperexcitabilité, perte de l'équilibre, tremblements, amaigrissement, puis décubitus) (Fig. 14). L'ESB serait propagée par la consommation de farines animales traitées de façon inappropriée ; par contre, il n'existe pas de cas de transmission horizontale de l'ESB d'un animal à l'autre au sein d'un même troupeau.

Fig. 14 : Vache atteinte d'ESB
Image issue du site http://www.larousse.fr

Contrairement à l'ESB, la tremblante des petits ruminants (ou scrapie) peut se comporter comme une véritable maladie contagieuse et apparaître dans un troupeau suite à l'introduction d'un animal infecté. La symptomatologie de la tremblante est assez proche de l'ESB (troubles du comportement, de la sensibilité et de la locomotion) avec une caractéristique courante supplémentaire : le prurit (Fig.15).

Fig. 15 : Mouton atteint de tremblante
Image issue du site http://www.avma.org

Globalement, les ESST peuvent avoir une origine génétique, acquise ou sporadique :

- Les maladies génétiques à prion, décrites essentiellement chez l'homme (et chez une vache porteuse de la mutation E211K et atteinte d'ESB atypique de type H (Nicholson *et al.* 2008)), sont induites par des mutations autosomiques dominantes dans la séquence codante du gène *prnp*. A titre d'exemple, la mutation la plus fréquemment retrouvée dans la forme familiale de la maladie de Creutzfeldt-Jakob est la mutation E200K (Kovacs *et al.* 2010b),
- Les formes acquises des ESST ont pour origine l'introduction de PrPd dans l'organisme lors d'un acte iatrogène (administration d'hormones de croissance humaine, greffes de dure-mère humaines ou de cornée, voire utilisation d'instruments contaminés lors de

neurochirurgies) ou par ingestion de matériel biologique infectieux. Chez les animaux, ce groupe d'ESST comprend l'ensemble des maladies transmises entre membres d'une même espèce ou entre membres d'espèces différentes, comme par exemple la tremblante ou l'ESB classique (ESB-C). Chez l'homme, on peut citer pour exemple le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, apparu entre 1994 et 1995 au Royaume-Uni, qui touche des patients relativement jeunes (29 ans en moyenne), et qui serait dû à la consommation de viande bovine infectée par l'agent de l'ESB,

- Les formes sporadiques des maladies à prion ont une origine inconnue ; elles apparaissent généralement sous forme de cas isolés, touchant plutôt des patients ou des animaux âgés au regard de l'espérance de vie de l'espèce considérée. Chez l'homme, la forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob représente 85 à 90 % des cas et affecte des personnes entre 45 et 75 ans. Chez les bovins, depuis 2004, ont été identifiées deux formes atypiques de l'ESB, l'ESB de type H (ESB-H) (Biacabe *et al.* 2004) et l'ESB de type L (ESB-L) (Casalone *et al.* 2004), qui sont considérées comme des ESST probablement sporadiques. La tremblante atypique Nor98 qui atteint les petits ruminants serait elle aussi une maladie à prion sporadique (Benestad *et al.* 2003).

e) Caractérisation des maladies à prion

En complément des approches cliniques et épidémiologiques, la caractérisation des maladies à prion passe par les examens des lésions cérébrales et des dépôts de protéines prion pathologiques au sein du SNC de l'hôte infecté, par l'étude des caractéristiques biochimiques de la PrPd, et par des essais d'inoculation sur modèles expérimentaux.

Examen neuropathologique

A partir de coupes histologiques du cerveau, l'examen neuropathologique permet de mettre en évidence une perte neuronale, une spongiose (vacuolisation du cytoplasme et des dendrites des neurones), une prolifération de certains types cellulaires (gliose, hyperastrocytose) et une présence éventuelle de plaques amyloïdes (Fig. 16).

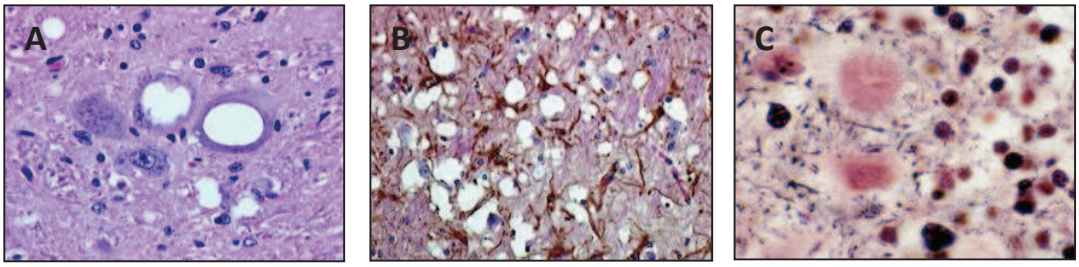


Fig. 16 : Anomalies histologiques du SNC caractéristiques des ESST

A : coupe histologique du cerveau d'un mouton atteint de tremblante, présentant une spongiose - *Image issue du site http://www.inra.fr*, **B** : coupe histologique du cerveau d'un mouton atteint de tremblante, montrant un aspect caractéristique de gliose après marquage des astrocytes à l'aide d'un anticops anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) - *Image issue du site http://www.inra.fr*, **C** : coupe histologique du cerveau d'un patient atteint de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, présentant des plaques amyloïdes colorées au rouge congo - *Image issue du site http://www.inserm.fr*

Examen immunohistochimique

Il consiste à mettre en évidence la protéine prion pathologique *in situ* par l'utilisation d'anticorps. Les anticorps n'étant pas spécifiques de la forme pathologique de la protéine, il est nécessaire de pré-traiter les échantillons à l'aide de protéinase K, ou/et autoclavage, ou/et acide formique, de façon à détruire la PrPc tout en démasquant les sites antigéniques de la PrPd (Fig. 17).

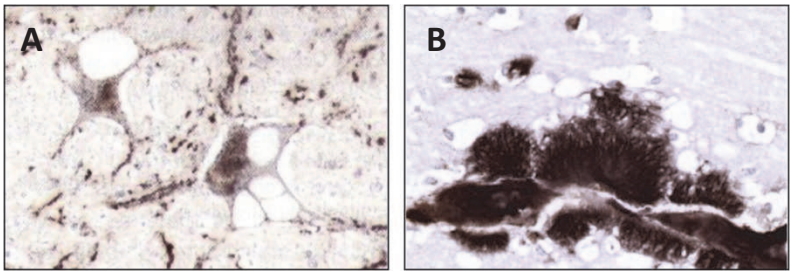


Fig. 17 : Détection de dépôts de PrPd par immunohistochimie

A : Marquages intra-neuronaux de la PrPd au niveau du mésencéphale (noyau rouge) d'une vache atteinte d'ESB-C (Debeer *et al.* 2003), **B** : dépôts amyloïdes péri-vasculaires de PrPd au niveau de la substance grise du cortex d'un mouton atteint de tremblante (Lezmi *et al.* 2011)

Caractérisation moléculaire

La caractérisation moléculaire de la PrPd débute par une ou plusieurs étapes de pré-traitement visant à distinguer la PrPd de la PrPc en utilisant ses propriétés :

- D'insolubilité en présence de détergents, qui peuvent être mises en évidence par ultracentrifugation (Chiesa *et al.* 2003) ou par précipitation en acide phosphotungstique (Wadsworth *et al.* 2001) des échantillons,
- D'agrégation de la PrPd, qui peut être révélé par filtration différentielle par exemple (Kobayashi *et al.* 2005),
- De résistance aux protéases de la PrPd (et en l'occurrence à la protéinase K)(Kuczius *et al.* 1999).

La PrPd ainsi extraite peut être révélée par Western-blot ou ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay), *via* l'utilisation d'anticorps, voire de ligands chimiques ayant la capacité d'interagir avec la protéine prion.

L'analyse des profils moléculaires obtenus en Western-blot peut permettre de distinguer différentes formes d'ESST en fonction de (Fig. 18) :

- Leur niveau de résistance à la protéinase K (la fraction de la protéine prion résistante à la protéinase K est nommée PrPres),
- Le poids moléculaire des formes non-glycosylées de la PrPres,
- La répartition des différentes glycoformes,
- Leur immunoréactivité différentielle obtenues avec différents anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes distincts.

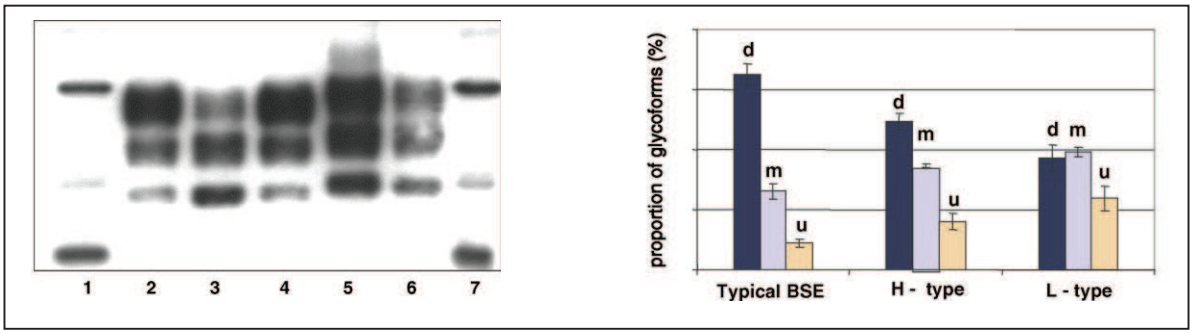


Fig. 18 : Classification des ESST chez la vache selon leur profil en Western-blot (Baron *et al.* 2007)
A gauche, profils électrophorétiques de l'ESB-C (pistes 2 et 4), de l'ESB-L (piste 3) et de l'ESB-H (pistes 5 et 6) obtenus après digestion à la protéinase K et immunodétection avec un anticorps anti-prion. A droite, graphe présentant l'analyse des proportions des différentes glycoformes (d : bande bi-glycosylée, m : bande mono-glycosylée, u : bande non-glycosylée). Par rapport à l'ESB-C, l'ESB-H présente un poids moléculaire apparent plus élevé pour la forme non-glycosylée de la PrPres. L'ESB-L présente quant à elle un poids moléculaire apparent moins élevé pour la forme non-glycosylée de la PrPres que l'ESB-C et une répartition des proportions des bandes bi- et mono-glycosylées différentes de celle de l'ESB-C.

Etude de transmission sur modèles expérimentaux et notion de souches d'ESST

Les agents responsables des ESST présentent des variations de souches qui peuvent être étudiées grâce à leur transmission expérimentale à des souris, par inoculation intra-cérébrale ou périphérique. Cette technique, permettant de discriminer les souches de prion, est basée sur l'observation des caractéristiques de la maladie qu'elles induisent après plusieurs passages en série chez la souris. En effet, l'efficacité de la transmission des maladies à prion varie d'un individu à l'autre, et de surcroît d'une espèce à une autre : elle dépend à la fois de la souche de l'agent et de facteurs génétiques de l'hôte. Les passages en série d'une souche permettent un phénomène d'adaptation progressive du prion à son nouvel hôte qui se se traduit souvent par une réduction des périodes d'incubation et parfois par une augmentation du nombre d'animaux atteints. Une fois cette adaptation réalisée, l'agent est caractérisable par un ensemble de critères stables, qui lui sont

spécifiques. Ainsi, les différentes souches d'ESST sont définies par : un temps d'incubation prédictible de la maladie, des signes cliniques caractéristiques, une distribution et une intensité constantes des lésions neuropathologiques et des dépôts de PrPd, ainsi qu'un profil moléculaire particulier (Fraser *et al.* 1968; Dickinson *et al.* 1969; Bruce *et al.* 1991; Carp *et al.* 1991). C'est de cette façon qu'ont été isolées de nombreuses souches d'ESST suite, par exemple, à l'inoculation d'isolats de tremblante, d'ESB ou de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Cette technique a aussi participé à mettre en évidence le fait que l'ESB soit à l'origine, chez l'homme, du variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob : les inoculations d'homogénats de cerveaux provenant de vaches atteintes d'ESB ou de patients atteints du variant de la maladie de Creutzfldt-Jakob à des souris transgéniques exprimant la protéine prion bovine ont donné lieu à des temps d'incubation, des symptômes et des lésions identiques (Bruce *et al.* 1997).

III-2 Implication concomitante du prion et de l'α-synucléine dans une même maladie neurodégénérative

Les maladies neurodégénératives sont définies en fonction (Kovacs *et al.* 2010a) :

- de leur tableau clinique (déclin cognitif, démence, troubles moteurs…),
- des régions cérébrales et des types cellulaires affectés (neurones, cellules gliales…),
- de leur étiologie lorsque celle-ci est connue (formes héréditaires liées à des mutations génétiques par exemple),
- des protéines impliquées dans les processus pathogéniques.

Ainsi, de façon usuelle, les altérations du peptide β-amyloïde (A-β) et de la protéine tau sont associées à la maladie d'Alzheimer, celles de l'α-synucléine à la maladie de Parkinson et celles de la protéine prion aux ESST. Toutefois, ces associations sont loin d'être exclusives puisque la présence simultanée de plusieurs de ces protéines est communément observée au sein d'une même maladie.

a) Protéine prion et synucléinopathies

Des protéines connues pour leur implication dans des troubles neurodégénératifs n'étant pas des synucléinopathies peuvent intervenir dans la maladie de Parkinson : par exemple, des altérations de la protéine tau, communément associées à la maladie d'Alzheimer, sont détectées aux côtés de celles de l'α-synucléine dans des cerveaux de patients atteints de formes familiales (Duda *et al.* 2002) ou sporadiques (Jellinger 2010) de la maladie de Parkinson.

En ce qui concerne la présence de prion dans la maladie de Parkinson, plusieurs observations ont été publiées : tout d'abord, bien qu'aucune forme (ni pathologique, ni cellulaire) de la protéine

prion puisse être détectée au niveau des corps d'inclusions caractéristiques des synucléinopathies, des comarquages ont montré que l'α-synucléine et la PrPc peuvent être colocalisées au niveau de structures immatures de type « pré-agrégats » (Kovacs *et al.* 2002). Il a aussi a été rapporté que les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent des concentrations anormalement basses de PrPc dans leur liquide céphalo-rachidien (Meyne *et al.* 2009), ce qui suggère que le dosage de la PrPc dans les liquides circulants pourrait être un paramètre intéressant à étudier dans le cadre du développement de tests de diagnostic *ante-mortem*.

b) Altérations de l'α-synucléine et maladies à prion

Des formes pathologiques de l'α-synucléine peuvent être détectées dans des protéinopathies neurodégénératives n'étant pas des synucléinopathies : par exemple, des produits de troncation de l'α-synucléine sont présents chez des patients atteints de la forme « classique » de la maladie d'Alzheimer (c'est-à-dire la forme ne présentant pas conventionnellement de pathologie à corps de Lewy) (Lewis *et al.* 2010).

De même, des agrégats d'α-synucléine ont été identifiés en plus de l'accumulation de PrPd dans des cerveaux de patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, que celle-ci soit d'origine sporadique, iatrogène ou de type variant (Haik *et al.* 2002; Vital *et al.* 2007). Une étude récente, portant sur des cerveaux de patients atteints d'une forme héréditaire de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, a également permis la mise en évidence de dépôts d'α-synucléine, de protéine tau et de peptide A-β aux côtés de ceux de la PrPd (Kovacs *et al.* 2010b). Des formes altérées de l'α-synucléine, de la protéine tau et du peptide A-β ont également été détectées dans un cas de prionopathie variablement sensible aux protéases (Head *et al.* 2010). Chez les animaux, des analyses immunohistochimiques similaires à celles réalisées chez l'homme ont aussi permis d'identifier des formes pathologiques de l'α-synucléine dans des cas de tremblante naturelle chez des chèvres et des moutons (Adjou *et al.* 2007) ou chez des hamsters et des souris inoculés expérimentalement avec une souche de tremblante (Haik *et al.* 2002; Siso *et al.* 2002). Toutefois, aucun phénomène de colocalisation entre la PrPd et l'α-synucléine n'est relaté par ces données.

c) Relations entre l'α-synucléine et la protéine prion

La présence concomitante de plusieurs protéines dans une même pathologie incite à s'interroger sur la nature des relations que ces protéines ont les unes avec les autres et s'il existe potentiellement des interactions entre elles. Ainsi, des études *in vitro* ont révélé que le peptide A-β est capable de former des complexes hybrides avec la protéine tau, l'α-synucléine ou la protéine prion (Masliah *et al.* 2001; Guo *et al.* 2006; Tsigelny *et al.* 2008; Morales *et al.* 2010). L'α-synucléine

est aussi capable de s'associer avec la protéine tau, favorisant leur propre polymérisation en fibrilles (Schmidt *et al.* 1996; Marui *et al.* 2000; Giasson *et al.* 2003; Nonaka *et al.* 2010). Par contre, à l'heure actuelle, aucun article ne rapporte la formation d'oligomères mixtes d'α-synucléine et de protéine prion *in vitro*. De même, peu d'études visant à éprouver de façon expérimentale les interactions existant potentiellement entre la protéine prion et l'α-synucléine sont publiées. Seul un article récent montre que l'accumulation de PrPd, la perte synaptique et les troubles comportementaux associés à la souche de tremblante ME7 ne sont pas modifiés par la délétion spontanée du gène *snca* dans une sous-population de souris C57Bl/6 (Asuni *et al.* 2009). C'est ainsi que d'un côté, l'absence d'α-synucléine ne semble pas affecter les processus neurotoxiques déclenchés par la PrPd, alors que de l'autre, la neurodégénérescence et les dépôts de PrPd observés dans des cas humains et animaux de maladies à prion sont fréquemment associés à l'accumulation d'altérations de l'α-synucléine, sans pour autant qu'il y ait de colocalisation des protéines. Ces deux observations révèlent les lacunes qui existent dans la compréhension des relations que ces protéines entretiennent potentiellement. Le second article figurant dans cette thèse est lié à cette problématique : il a pour objet l'étude de la transmission de souches de prion à des souris transgéniques développant une synucléinopathie, afin de déclencher une co-pathologie associée à la fois au prion et de l'α-synucléine.

d) Implications diagnostiques des altérations protéiques

En définitive, les protéinopathies engendrant des troubles neurodégénératifs présentent des symptomatologies et des processus moléculaires complexes qui se recouvrent souvent, floutant les limites entre ces pathologies. Par exemple, la démence à corps de Lewy se situe, cliniquement comme anatomiquement, aux frontières de la maladie de Parkinson et de la maladie d'Alzheimer, sans qu'il soit toujours aisé de différencier ces pathologies les unes des autres. De plus, s'il existe des formes initialement « pures » de la maladie d'Alzheimer et des démences à corps de Lewy, il existe aussi des formes « associées », combinant des critères caractéristiques de ces deux pathologies : c'est la variante à corps de Lewy de la maladie d'Alzheimer.

L'identification de biomarqueurs spécifiques constituerait une avancée importante dans la prise en charge des patients atteints de maladie neurodégénérative, en permettant la mise en place d'outils de diagnostic *ante mortem* : ainsi, les dosages simultanés de plusieurs candidats biomarqueurs (α-synucléine, tau, Aβ42…) par des immuno-essais en multiplex pourraient être envisagés (Bibl *et al.* 2010). Idéalement, ces tests multiparamétriques offriraient la possibilité de réaliser un diagnostic fin et personnalisé, en déterminant pour chaque patient quelles sont les diverses composantes de la maladie neurodégénérative dont il est atteint. Cette avancée permettrait de stratifier les patients et de leur proposer un traitement adapté. La sensibilité de ces tests devra être suffisamment importante afin de détecter des variations fines des concentrations des

biomarqueurs pour qu'un diagnostic précoce soit établi avant l'apparition de lésions sévères et irrémédiables. L'accessibilité de ces biomarqueurs est également un critère important car leur présence dans le sérum, l'urine ou le liquide céphalo-rachidien garantit la mise en place de prélèvements peu invasifs. Enfin, ces tests diagnostics doivent répondre à une autre contrainte importante : ils doivent permettre de distinguer les phénomènes relevant de processus neurodégénératifs pathologiques de ceux inhérents au vieillissement naturel, lié à l'âge des individus (Dupiereux *et al.* 2009).

Par ailleurs, le caractère infectieux des maladies à prion, associé à l'existence de critères moléculaires robustes (correspondant à la détection des formes insolubles et résistantes à la protéinase K de la protéine prion) font que le diagnostic des ESSTs diffère de celui des autres maladies neurodégénératives : en effet, dès que la forme pathologique de la protéine prion est détectée dans le cerveau d'un individu, le diagnostic d'ESST est posé, qu'il y ait ou non présence d'autres altérations protéiques. Autrement dit, en raison des conséquences en termes de santé publique de l'identification de cas de maladies à prion, la détection de la PrPd prime sur la présence pathologique de toutes autres protéines (Kovacs *et al.* 2010a). Ainsi, en ce qui concerne les ESSTs, le développement de tests de diagnostic précoces permettrait le dépistage de protéines prion pathologiques dans le sang de donneurs pouvant conduire à des cas iatrogènes: en effet, 4 cas de patients infectés par le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob suite à une transfusion sanguine ont été décrits (Dupiereux *et al.* 2009; Ironside 2010).

En définitive, l'identification de biomarqueurs spécifiques visant à distinguer les différentes maladies neurodégénératives serait un progrès décisif, permettant le développement de tests diagnostiques et théranostiques, ces derniers étant dédiés au suivi de l'efficacité thérapeutique des traitements mis en place chez les patients.

III-3 Caractère « prion-like » de l'α-synucléine

De nombreuses revues générales ont récemment été consacrées à une hypothèse émergente suggérant que les altérations de l'α-synucléine se propageraient de la même manière que la PrPd au cours des maladies à prion (Soto *et al.* 2008; Aguzzi 2009; Angot *et al.* 2009; Olanow *et al.* 2009c; Angot *et al.* 2010; Frost *et al.* 2010; Lee *et al.* 2010b). Plusieurs auteurs proposent ainsi de parler du caractère « prion-like » de l'α-synucléine (Krammer *et al.* 2009; Brundin *et al.* 2010; Frost *et al.* 2010; Goedert *et al.* 2010), voire de qualifier l'α-synucléine de protéine « prionoïde » (Aguzzi 2009; Aguzzi *et al.* 2009; Cushman *et al.* 2010). Tous ces articles s'interrogeant sur l'élargissement du concept de

maladies à prion à d'autres protéinopathies neurodégénératives et en particulier à la maladie de Parkinson [« *Neurodegeneration : could they all be prion diseases ?* » (Miller 2009) ; « *Is Parkinson's disease a prion disorder ?* » (Olanow *et al.* 2009c)] ont pour socle des études mettant en avant les similitudes qui existent entre le développement des ESSTs et celui des pathologies liées à l'α-synucléine.

a) Propagation des altérations de l'α-synucléine dans le cerveau de patients parkinsoniens

Origine et développement de la maladie de Parkinson

The Dual-Hit Hypothesis (l'hypothèse du « coup double »), formulée par Heiko Braak et son équipe, suggère que la maladie de Parkinson aurait pour origine un pathogène inconnu ayant un tropisme pour le système nerveux. Ce pathogène pénètrerait dans l'organisme par inhalation puis rejoindrait le système digestif *via* la déglutition de salive contenant du mucus nasal (Fig. 19) (Hawkes *et al.* 2007; Hawkes *et al.* 2009). Selon cette hypothèse, ce « pathogène non-conventionnel possédant des propriétés proches de celles du prion », traverserait la barrière épithéliale et regagnerait le système nerveux central en suivant deux voies :

- Une voie antérograde allant de l'épithélium olfactif jusqu'aux lobes temporaux,
- Une voie rétrograde allant de l'épithélium entérique jusqu'à la partie caudale du tronc cérébral *via* les fibres sympathiques du nerf vague. Au sein du tronc cérébral, la pathologie de l'α-synucléine se propagerait selon un trajet ascendant allant du bulbe rachidien en passant par le mésencéphale (dont la substance noire) avant de rejoindre le cortex.

Cette hypothèse visant à expliquer les processus de propagation des altérations de l'α-synucléine récapitule la chronologie de l'apparition des symptômes de la maladie de Parkinson, qui débute par des déficits de l'olfaction, des perturbations du sommeil, des problèmes de constipation et des troubles de l'érection, se poursuivant par l'apparition des symptômes moteurs caractéristiques (tremblements, akinésie, rigidité) évoluant vers un déclin des fonctions cognitives et des symptômes psychiatriques (Fig. 19).

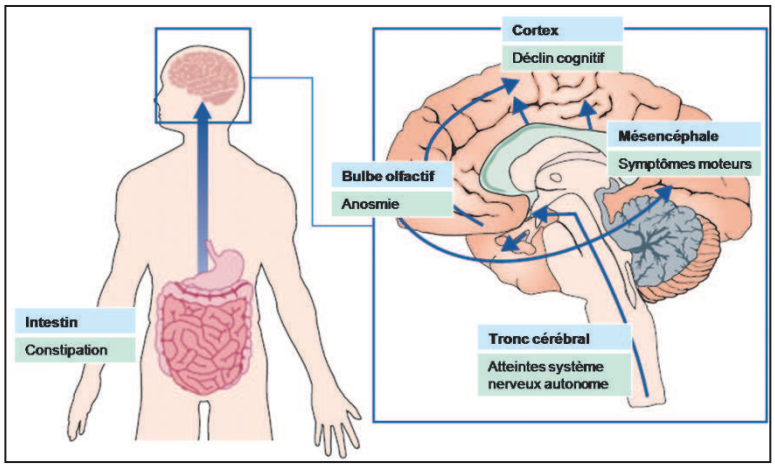


Fig. 19 : Illustration de l'hypothèse de Braak concernant la propagation des altérations de l'α-synucléine au cours de la maladie de Parkinson
La neuropathologie associée à la maladie de Parkinson aurait une double origine : elle se propagerait à partir de l'intestin et du bulbe olfactif, évoluant vers le tronc cérébral et les lobes temporaux. Les flèches bleues symbolisent la progression des atteintes du système nerveux central selon une voie ascendante.
Source image (Angot et al. 2010)

En définitive, selon Heiko Braak, la pathologie liée à l'α-synucléine se propagerait au cours de la maladie de Parkinson de façon séquentielle et prédictive : d'une façon comparable à la transmission de la PrPd au cours des ESSTs, les altérations de l'α-synucléine se transmettraient de cellules nerveuses en cellules nerveuses.

Le développement progressif de corps de Lewy au sein de neurones greffés à des patients parkinsoniens dans un but curatif est une autre constatation plaidant en faveur de la transmissibilité des altérations de l'α-synucléine.

Développement de corps de Lewy dans des greffes neuronales

Dans un but curatif, des essais de transplantation par stéréotaxie de neurones dopaminergiques d'origine embryonnaire sont réalisés depuis une vingtaine d'années chez des patients parkinsoniens. Les analyses *post mortem* en immunohistochimie des cerveaux de 8 patients morts plus d'une dizaine d'années après avoir été opérés, ont révélés la présence de corps de Lewy dans les neurones transplantés (Kordower *et al.* 2008a; Kordower *et al.* 2008b; Li *et al.* 2008). Ces corps de Lewy ont exactement les mêmes caractéristiques que ceux initialement présents dans la substance noire des patients atteints de la maladie de Parkinson (présence

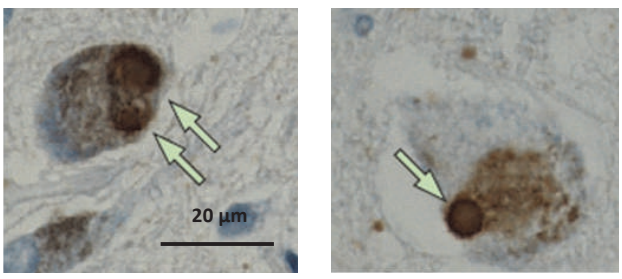


Fig. 20 : Immunodétection de l'α-synucléine au sein de corps de Lewy dans des neurones greffés chez un patient parkinsonien 16 ans son décès (à gauche) et dans des neurones de la substance noire de l'hôte (à droite).
Source image (Angot et al. 2010)

d'ubiquitine et d'α-synucléine fibrillaire largement phosphorylée en sérine 129) (Li *et al.* 2008; Chu *et al.* 2010) (Fig. 20). Le développement des corps de Lewy dans les neurones transplantés n'est pas lié au transfert d'une cellule à l'autre des corps de Lewy dans leur intégralité (Li *et al.* 2010): c'est un processus graduel qui relèverait davantage de la transmission d'altérations moléculaires de l'α-synucléine des cellules de l'hôte au greffon, rappelant la manière dont se propage la PrPd (Brundin *et al.* 2008; Angot *et al.* 2009).

Afin de confirmer et d'analyser le caractère transmissible (qualifié de « prion-like » de l'α-synucléine) des modèles animaux permettant, soit de reproduire le développement d'une synucléinopathie à l'échelle d'un organisme, soit de mimer le transfert d'α-synucleine de cellules hôtes à un greffon, ont été développés.

b) Modèles animaux reproduisant expérimentalement la transmission des altérations de l'α-synucléine

Modèle murin de transfert de l'α-synucléine à des cellules souches neurales greffées

La première preuve expérimentale du transfert intercellulaire d'α-synucléine *in vivo* provient de la greffe de cellules souches neurales murines dans l'hippocampe de souris transgéniques surexprimant l'α-synucléine humaine sous le contrôle du promoteur Thy-1 (Rockenstein *et al.* 2002) : de 1 à 4 semaines après la greffe, les cellules progénitrices neurales issues du greffon commencent à être immunodétectées par un anticorps spécifique de l'α-synucléine humaine, montrant la transmission de cette dernière des cellules de l'hôte aux cellules greffées (Desplats *et al.* 2009). Mais cette première étude réalisée par l'équipe de Seung-Jae Lee et Paula Desplats ne reproduit que partiellement les constatations inhérentes à l'atteinte des tissus greffés chez les patients parkinsoniens puisque l'utilisation de ce modèle murin ne permet pas d'engendrer la formation de véritable corps de Lewy dans le greffon (il y a bien développement de corps d'inclusions riches en α-synucléine, mais ceux-ci ne sont pas de nature fibrillaire). De plus, le protocole utilisé chez ces souris présente des divergences notoires avec les essais de greffes thérapeutiques qui ont donné lieu à l'observation du développement d'une pathologie liée à l'α-synucléine dans les greffons : les essais cliniques sont réalisés avec des neurones post-mitotiques (et non des cellules souches en prolifération) qui sont injectés dans le striatum des patients (et non dans l'hippocampe comme dans ce modèle).

Dans le but de reproduire plus fidèlement la synucléinopathie apparaissant dans les greffons de patients parkinsoniens, l'équipe de Patrik Brundin a greffé des neurones provenant de

mésencéphales d'embryons de souris sauvages dans le striatum d'une souris surexprimant l'α-synucléine humaine sous le contrôle du promoteur endogène de l'α-synucléine : des analyses en immunohistochimie ont révélé que, six mois après la greffe, les neurones murins du greffon présentent bien de l'α-synucléine humaine issue de l'hôte (Hansen *et al.* 2011).

Modèle murin de la propagation progressive des altérations de l'α-synucléine

Comme précédemment décrit dans le paragraphe relatif aux modèles animaux de la maladie de Parkinson basés sur l'intoxication par des substances neurotoxiques, l'administration intragastrique de roténone chez des souris C57Bl/6 permet de reproduire le développement progressif d'inclusions intra-cellulaires d'α-synucléine : ainsi, comme dans l'hypothèse d'Heiko Braak, la pathologie liée à l'α-synucléine débute chez ces souris dans le système nerveux entérique avant de s'étendre de façon séquentielle à la moelle épinière, au tronc cérébral puis à la *substantia nigra* (Pan-Montojo *et al.* 2010). Ces résultats suggèrent que l'administration intragastrique de roténone engendrerait la formation d'agrégats d'α-synucléine au niveau des nerfs entériques, lesquels se propageraient ensuite aux zones vulnérables du système nerveux central *via* des mécanismes qui pourraient impliquer le transfert intercellulaire des altérations de l'α-synucléine (Angot *et al.* 2010).

Modèle murin de transfert de l'α-synucléine des neurones aux cellules gliales

La lignée murine TgD9 *(cf paragraphe sur les modèles génétiques)* surexprime le gène humain sauvage de l'α-synucléine sous le contrôle du promoteur neuronal hPDGF-β (Masliah *et al.* 2000). Bien que l'α-synucléine soit exprimée dans cette lignée transgénique uniquement dans les neurones, des accumulations pathologiques d'α-synucléine ont été observées également dans les cellules gliales, suggérant un transfert intercellulaire de l'α-synucléine des neurones vers l'astroglie (Lee *et al.* 2010a).

Modèle murin de transfert d'α-synucléine recombinante à des neurones

Des essais d'injection intra-cérébrale par stéréotaxie de molécules d'α-synucléine recombinantes couplées à des fluorochromes ont été réalisés par l'équipe de Patrik Brundin chez des souris transgéniques surexprimant l'α-synucléine humaine sauvage sous le contrôle du promoteur du gène *snca*. Ces essais ont montré des phénomènes d'internalisation dans des neurones adjacents au site d'injection et ce, quelque soit la forme d'α-synucléine a été administrée (monomérique, oligomérique ou fibrillaire). L'injection de fibrilles donne lieu à des marquages neuronaux punctiformes alors que celle d'α-synucléine monomérique génère un marquage diffus. Cette oberservation laisse penser que les processus d'internalisation de l'α-synucléine préservent sa structure quaternaire (Hansen *et al.* 2011).

Dans le but de comprendre comment les altérations de l'α-synucléine se transmettent non plus à l'échelle d'un organisme, mais à l'échelle cellulaire cette fois-ci, des modèles *in vitro* ont été mis au point.

c) Etudes *in vitro* de la transmission des altérations de l'α-synucléine

Transfert d'α-synucléine d'un neurone à une autre cellule en culture

Seung-Jae Lee et son équipe ont complété leur étude *in vivo* du transfert intercellulaire d'α-synucléine par un modèle *in vitro* mettant en jeu deux populations de cellules neuronales humaines dopaminergiques (Desplats *et al.* 2009): d'une part, des « cellules donneuses » surexprimant l'α-synucléine marquée par une étiquette *myc*, d'autre part, des « cellules réceptrices » produisant (sans surexpression) de l'α-synucléine marquée par un autre traceur. Après une co-culture de 24h, de l'α-synucléine issue des cellules donneuses est détectée par immunofluorescence dans les cellules réceptrices, formant parfois des corps d'inclusions à proximité des noyaux. Approximativement la moitié de ces corps d'inclusions présentent une structure fibrillaire ainsi que de l'ubiquitine, comme dans les corps de Lewy (Desplats *et al.* 2009). Ces résultats ont été confirmés et complété par ceux de l'équipe de Patrik Brundin qui a généré deux lignées de cellules SH-SY5Y différenciées produisant des protéines de fusion de façon stable : l'une sécrète abondamment de l'α-synucléine couplée à une protéine fluorescente verte (GFP-αsyn) ; l'autre exprime à un niveau faible de l'α-synucléine liée à une protéine fluorescente rouge (αsyn-DsRed). Après 8 jours de co-culture, environ 15% des cellules produisant l'αsyn-DsRed présentent des doubles marquages, révélant l'internalisation des molécules de GFP-αsyn. Après 14 jours, des images de microscopie à épifluorescence montrent que la GFP-αsyn transférée forme des agrégats entourés d'halos de molécules d'αsyn-DsRed endogènes, ce qui semble suggérer que l'α-synucléine internalisée agirait comme un inducteur de l'agrégation (Hansen *et al.* 2011).

Selon ces essais, le transfert intercellulaire d'α-synucléine ne nécessiterait pas un contact direct entre les cellules : l'α-synucléine serait sécrétée par exocytose ou libérée dans le milieu de culture après la mort des cellules donneuses. Les formes oligomérisées de l'α-synucléine seraient ensuite internalisées par des cellules réceptrices par endocytose (Desplats *et al.* 2009; Hansen *et al.* 2011). Les monomères d'α-synucléine auraient quant à eux la capacité de se transloquer de façon passive au travers des membranes plasmiques (Ahn *et al.* 2006).

Des essais de co-cultures d'astrocytes et de neuroblastomes SH-SY5Y surexprimant l'α-synucleine humaine ont permis de mettre en évidence le transfert d'α-synucléine des cellules

neuronales aux cellules gliales, lesquelles développent alors des corps d'inclusion. Cette étude aboutit aussi à la conclusion que ce transfert ferait intervenir des processus d'endocytose / exocytose (Lee *et al.* 2010a).

Ajout de fibrilles d'α-synucléine recombinante dans le milieu de culture

La transmission des altérations de l'α-synucléine peut aussi être modélisée *in vitro* par l'ajout de fibrilles d'α-synucléine dans le milieu de culture de cellules surexprimant l'α-synucléine.

En effet, l'addition d'oligomères, générés *in vitro* à partir d'α-synucléine recombinante dans le milieu de culture d'une lignée de neuroblastomes surexprimant l'α-synucléine humaine mutée en A53T (SH-SY5Y α-syn [A53T]), provoque la formation d'agrégats intracellulaires (Danzer *et al.* 2007). Des résultats similaires ont été obtenus par la même équipe sur des cultures primaires de neurones issus de cortex d'embryons de souris de 14 jours (Danzer *et al.* 2009). L'induction transmembranaire de l'agrégation de l'α-synucléine augmente en fonction du temps de contact des cellules avec le milieu de culture. Elle est aussi d'autant plus importante que la concentration des oligomères dans le milieu est élevée (Danzer *et al.* 2009).

L'équipe de Virginia Lee a également décrit l'apparition de formes agrégées intra-cytoplasmiques d'α-synucléine suite à l'introduction de fibrilles d'α-synucléine recombinante dans le milieu de culture de lignées cellulaires modifiées surexprimant l'α-synucléine (Luk *et al.* 2009) : contrairement aux monomères ou aux petits oligomères d'α-synucléine, ces fibrilles extracellulaires ont la capacité de recruter l'α-synucléine endogène soluble et de la convertir en agrégats insolubles dans les détergents, s'accumulant au sein de corps d'inclusions. Ces corps d'inclusions présentent des caractéristiques proches des corps de Lewy présents dans les synucléinopathies humaines : l'α-synucléine qui les compose majoritairement est abondamment phosphorylée sur les résidus sérine 129 ; et ils sont également riches en ubiquitine (Luk *et al.* 2009).

d) Similitudes des mécanismes moléculaires inhérents à la transmission des altérations de l'α-synucléine et de la protéine prion

Synthèse et morphologie des espèces toxiques de l'α-synucléine et de la protéine prion

Les processus moléculaires conduisant à l'accumulation neurotoxique des formes altérées de l'α-synucléine ont de nombreux points communs avec la façon dont se propage la PrPd. Dans les deux cas intervient un phénomène de transconformation au cours duquel les molécules acquièrent une structure comportant une prédominance de feuillets β. La formation d'agrégats pathologiques

débute alors par une première étape, lente et critique au cours de laquelle des oligomères solubles s'assemblent entre eux pour former un noyau ; la seconde étape, plus rapide, correspond à une phase d'élongation du polymère par recrutement de monomères (Jarrett *et al.* 1993; Weissmann 1995; Wood *et al.* 1999; Chen *et al.* 2007; Angot *et al.* 2010) (Fig. 21).

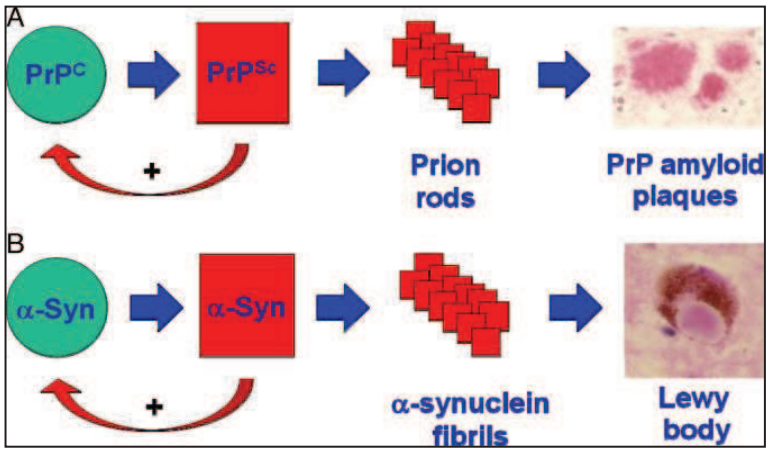


Fig. 21 : Schéma illustrant les similitudes existant entre les mécanismes neurotoxiques conduisant aux dépôts de PrPd sous forme de plaques amyloïdes dans les ESSTs (A) et ceux conduisant à l'accumulation d'α-synucléine au sein des corps de Lewy caractéristiques de la maladie de Parkinson (B) *(Olanow et al. 2009c)*

La morphologie des fibrilles d'α-synucléine constituant les corps d'inclusion rappelle celle de la PrPd s'accumulant sous forme de dépôts dans les maladies à prion : il s'agit de structures fibrillaires comportant une prédominance de feuillets β, disposés de façon anti-parallèle les uns aux autres et ayant des propriétés d'insolubilité dans les détergents et de résistance à la protéolyse (Conway *et al.* 2000a; Angot *et al.* 2010) (Fig. 22).

Transfert intercellulaire de l'α-synucléine et du prion

Le transfert d'une cellule à l'autre de la PrPd peut être réalisé soit par des mécanismes d'exocytose / endocytose soit par des tunnels reliant deux cellules entre elles *via* la formation d'excroissances de la membrane plasmique. Même si les processus de libération et de capture de l'α-synucléine par les cellules restent mal connus, les études mentionnées ci-dessus conduisent à penser que ceux-ci feraient intervenir des phénomènes d'exocytose / endocytose proches de ceux décrits lors de l'infection de nouvelles cellules par le PrPd (Lee *et al.* 2005; Lee *et al.* 2008a; Angot *et al.* 2009; Angot *et al.* 2010; Hansen *et al.* 2011) (Fig. 22).

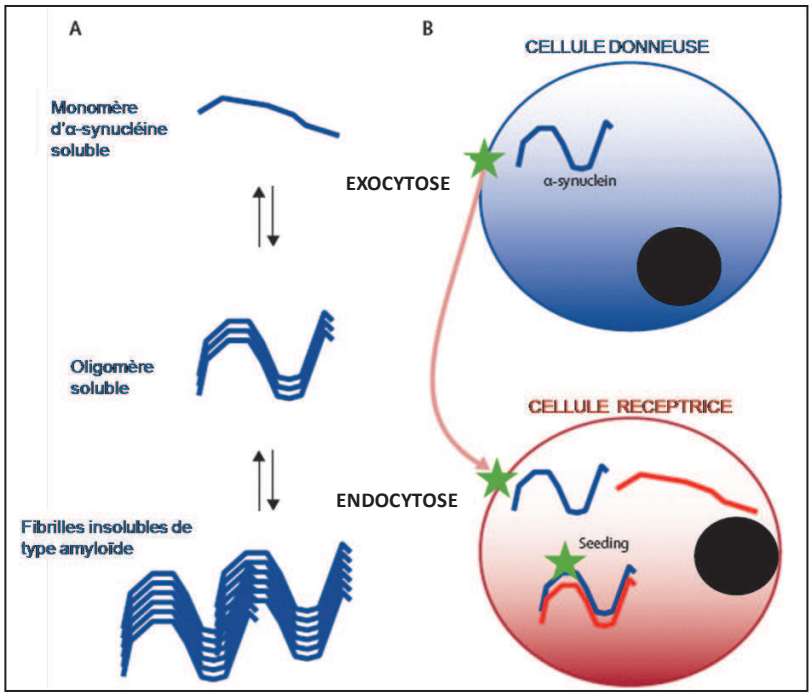


Fig. 22 : Mécanismes « prion-like » de la formation des fibrilles d'α-synucléine (A) et de leur propagation d'une cellule à l'autre (B) (Angot *et al.* 2010)
Les formes neurotoxiques de l'α-synucléine seraient libérées dans l'espace intercellulaire par exocytose ou au moment de la mort neuronale. L'α-synucléine issue de la cellule donneuse pourrait être par la suite prélevée par les cellules réceptrices, *via* des phénomènes de translocation passive (pour les formes de bas poids moléculaires) ou par endocytose (pour les oligomères). Une fois internalisées, les formes neurotoxiques de l'α-synucléine recrutent des monomères endogènes solubles, induisant leur transconformation puis leur agrégation.
Les étoiles vertes indiquent des cibles potentielles pour des thérapies visant à diminuer la dissémination des altérations de l'α-synucléine à travers le système nerveux des patients atteints de synucléinopathies

L'importance des phénomènes d'endocytose dans la propagation de l'α-synucléine d'une cellule à l'autre est soutenue par des études récentes : *in vitro*, le transfert inter-cellulaire d'α-synucléine observé au sein de co-cultures de SH-SY5Y exprimant des protéines de fusion est amoindri par l'ajout d'inhibiteur de l'endocytose (Hansen *et al.* 2011). De même, *in vivo,* chez le rat, l'injection intra-corticale d'inhibiteurs de l'endocytose, de façon conjointe à celle d'α-synucléine recombinante couplée à un fluorochrome, atténue l'internalisation de cette dernière dans les neurones adjacents au site d'injection (Hansen *et al.* 2011).

Effets cytotoxiques de l'α-synucléine et du prion

Enfin, les mécanismes cytotoxiques inhérents aux formes pathologiques du prion et de l'α-synucléine présentent aussi beaucoup de similitudes : dans les deux cas, il s'agit de l'accumulation de protéines mal conformées conduisant à l'engorgement des systèmes protéolytiques (lysosome,

protéasome) aboutissant à une aggravation de l'accumulation d'espèces protéiques neurotoxiques ayant pour conséquence la mort cellulaire (Olanow *et al.* 2009c).

e) Conséquences du caractère « prion-like » de l'α-synucléine

Par conséquent, le développement séquentiel et prédictif de la pathologie liée à l'α-synucléine dans la maladie de Parkinson et dans des modèles murins de synucléinopathies, ainsi que la transmission des altérations de l'α-synucléine de neurones affectés à des cellules saines (observée aussi bien dans des essais de greffes thérapeutiques chez des patients parkinsoniens que dans des modèles *in vitro* et *in vivo*) suggèrent que « l'α-synucléine se comporte comme un prion » (Olanow *et al.* 2009c).

Cependant, les maladies à prion se distinguent des synucléinopathies par le fait qu'elles sont transmissibles entre individus et même entre espèces. Aucune étude épidémiologique, ni aucune publication rapportant des cas de propagation inter-individuelle de la maladie de Parkinson n'a été publiée à ce jour, supportant la conclusion selon laquelle la maladie de Parkinson ne serait pas une pathologie contagieuse (Angot *et al.* 2010). Plusieurs hypothèses tentent d'apporter des éléments qui permettraient d'expliquer cette différence :

- Tout d'abord, il a été mis en avant que la PrPd divergerait des propriétés « prion-like » de l'α-synucléine par le fait qu'elle possède une extraordinaire résistance aux procédés classiques d'inactivation des microorganismes. L'α-synucléine est plus sensible que le prion aux variations physico-chimiques de l'environnement, ce qui limiterait sa capacité à passer d'une personne à l'autre (Miller 2009). Mais cette première explication doit être modulée par le fait que ce ne sont pas forcément les formes les plus résistantes de la PrPd qui seraient les plus virulentes : en effet, comme précédemment abordé dans le paragraphe intitulé « Pathogénicité des protéines prion », il ne semble pas toujours exister de lien entre la virulence, la transmissibilité et les propriétés de résistance des souches de prion,
- Ensuite, il a été montré que la PrPd aurait une capacité à se disséminer supérieure à celle de l'α-synucléine : en effet, les agrégats de PrPd étant plus instables que les structures fibrillaires de l'α-synucléine, il auraient la possibilité de se briser, puis de se répandre sous forme de particules pathologiques ayant à leur tour le pouvoir de transconformer la PrPc en PrPd et ainsi de propager la maladie (Tanaka *et al.* 2006; Soto *et al.* 2008; Angot *et al.* 2010).

Ces constatations inhérentes à la différence entre les capacités de l'α-synucléine et du prion à se transmettre entre individus nous amène à interpréter l'hypothèse d'Heiko Braak d'une certaine manière : en effet, il parait peu plausible que le « pathogène non-conventionnel possédant des propriétés proches de celles du prion » dont l'ingestion ou l'inhalation serait à l'origine de la maladie de Parkinson soit directement une forme altérée de l'α-synucléine. Toutefois, la pénétration dans l'organisme de substances neurotoxiques (comme des pesticides) par voies gastriques et/ou respiratoires, pourrait être, de façon plus probable, un évènement initial déclenchant l'apparition d'altérations de l'α-synucléine en périphérie.

Enfin, si aucune étude ne rapporte des cas de transmission entre individus de la maladie de Parkinson, cela ne signifie pas nécessairement que les altérations de l'α-synucléine n'aient pas la capacité d'être transférées entre individus dans certaines conditions.

Résultats expérimentaux

Lorsque ma thèse a commencé en 2007, l'étude des maladies à prion était au cœur de l'activité de l'unité ATNC (pour Agents Transmissibles Non Conventionnels) de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Ce sont les similitudes existant entre les mécanismes moléculaires responsables des maladies à prion et des pathologies liées à l'α-synucléine, associées certaines données suggérant la présence concomitante de formes altérées de l'α-synucléine et de PrPd dans une même maladie neurodégénérative, qui nous ont conduits à étudier les relations potentielles pouvant exister entre les pathologies de l'α-synucléine et les maladies à prion.

La première partie de mon travail a été consacrée au développement et à la caractérisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'α-synucléine. Comme la protéine prion, l'α-synucléine est présente de façon endogène et ubiquitaire chez les vertébrés. Sa séquence en amino-acides étant hautement conservée entre les espèces, la principale difficulté inhérente à ce projet était de réussir à contourner la tolérance au soi du système immunitaire d'un hôte murin, afin de déclencher une production d'anticorps dirigés contre l'α-synucléine humaine recombinante. Pour cela, nous nous sommes inspirés de ce qui avait été préalablement fait dans le domaine du prion en utilisant comme hôtes des souris n'exprimant pas de façon endogène l'immunogène, c'est-à-dire l'α-synucléine (Prusiner *et al.* 1993; Betemps *et al.* 2001). Les résultats inhérents à l'étude des réponses immunitaires obtenues, ainsi que la sélection des anticorps monoclonaux anti α-synucléine qui en ont découlé, font l'objet du premier article proposé dans cette thèse (Mougenot *et al.* 2010). Cette publication aborde aussi la caractérisation d'un anticorps, baptisé AS11, en illustrant sa capacité à détecter différentes formes d'α-synucléine en Western-blot, en immunohistochimie et en immunofluoresence (Mougenot *et al.* 2010).

Cette première partie méthodologique a été suivie par la mise en place de techniques biochimiques visant à identifier de façon spécifique les altérations moléculaires de l'α-synucléine cérébrale. Ces travaux ont permis d'établir une corrélation entre la détection de formes insolubles dans les détergents et phosphorylées en sérine 129 de l'α-synucléine et l'apparition de signes cliniques moteurs sévères, lors du vieillissement d'un modèle murin transgénique surexprimant l'α-synucléine humaine mutée en A53T (lignée TgM83). Cette mutation ponctuelle du gène humain de l'α-synucléine est responsable de cas héréditaires de la maladie de Parkinson.

Afin d'étudier quels sont les impacts de la présence concomitante de formes pathologiques de la protéine prion (PrPd) et de l'α-synucléine dans une même maladie neurodégénérative, nos travaux de recherche se sont ensuite poursuivis par le développement d'un modèle expérimental reproduisant de façon conjointe ces deux types d'altérations. Pour cela, des souris transgéniques TgM83 surexprimant l'α-synucléine humaine mutée ont été inoculées, par voie intra-cérébrale, avec

des homogénats de cerveaux de souris contenant : soit une souche de tremblante classique des petits ruminants, soit une souche d'encéphalopathie spongiforme bovine classique, soit une souche d'encéphalopathie spongiforme bovine de type H. Le deuxième article apparaissant dans cette thèse présente les résultats obtenus lors de l'inoculation de ces souches à des souris TgM83, en termes de durées de survie des animaux, d'accumulation de PrPd et de présence d'altérations moléculaires de l'α-synucléine.

Enfin, dans un troisième volet, nous nous sommes intéressés à un autre aspect du lien pouvant exister entre les maladies à prion et les pathologies associées à l'α-synucléine : de nombreuses revues récentes soutiennent en effet l'hypothèse selon laquelle les altérations de l'α-synucléine se propageraient de la même manière que la PrPd au cours des maladies à prion (Soto *et al.* 2008; Aguzzi 2009; Angot *et al.* 2009; Olanow *et al.* 2009c; Angot *et al.* 2010; Frost *et al.* 2010; Lee *et al.* 2010b). Plusieurs auteurs proposent ainsi d'utiliser les termes de « prion-like » pour qualifier l'α-synucléine (Krammer *et al.* 2009; Brundin *et al.* 2010; Frost *et al.* 2010; Goedert *et al.* 2010). En s'inspirant de ce qui est couramment fait pour caractériser les maladies à prion, nous avons mis en place des essais visant à tester la capacité des altérations de l'α-synucléine à être transmises expérimentalement d'une souris à l'autre. Dans ce but, de jeunes souris TgM83 asymptomatiques, n'ayant pas encore développé de pathologie liée à l'α-synucléine, ont été inoculées par voie intra-cérébrale avec des homogénats de cerveaux contenant des altérations moléculaires de l'α-synucléine. Ces inoculums ont été réalisés à partir de cerveaux de souris TgM83 euthanasiées suite à l'observation de signes cliniques conséquents au développement d'une synucléinopathie. Les résultats de cet essai de propagation expérimentale des formes pathologiques de l'α-synucléine sont exposés dans le troisième article de ma thèse.

I. Développement et caractérisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'α-synucléine humaine

Résumé des résultats publiés dans Journal of Neuroscience Methods (Mougenot *et al.* 2010)

Disposer d'anticorps monoclonaux performants, spécifiques de l'α-synucléine humaine, est essentiel pour l'étude des mécanismes neurodégénératifs impliqués dans la maladie de Parkinson, la demence à corps de Lewy et l'atrophie multi-systématisée. Cependant, la très forte homologie entre les séquences en acides aminés des α-synucléines humaine et murine fait que la production de tels anticorps chez la souris peut être entravée par des phénomènes d'immunotolérance développés par l'hôte.

Afin de contourner ce problème, nous avons choisi d'immuniser à l'aide d'α-synucléine recombinante humaine des souris C57Bl/6S possédant une délétion naturelle du gène *snca* codant pour l'α-synucléine. Ces souris présentent des taux d'anticorps polyclonaux anti α-synucléine circulants supérieurs à ceux observés suite à l'immunisation de souris C57Bl/6J sauvages ou BALB/c. A l'inverse, la conformation de l'immunogène ne modifie pas l'intensité de cette réponse immunitaire spécifique : les injections d'α-synucléine sous forme native ou sous forme fibrillaire engendrent des taux d'anticorps sériques similaires.

Trois souris C57Bl/6S (immunisées avec la forme native ou avec la forme fibrillaire de l'α-synucléine) possédant des titres élevés d'immunoglobulines d'isotype G (IgG) circulantes ont été sélectionnées afin que leurs splénocytes soient fusionnés avec des cellules myelomateuses murines SP2/0. Mais les étapes de criblage des clones producteurs d'anticorps monoclonaux anti α-synucléine ont abouti à la sélection d'une seule IgG parmi une très grande majorité d'IgM.

La spécificité et la réactivité de cette IgG, nommée AS11 et reconnaissant un épitope situé dans la partie N-terminale de l'α-synucléine humaine, ont été étudiées dans diverses immunotechniques (Western-blot, immunofluorescence, immunohistochimie). La capacité d'AS11 à reconnaitre à la fois les formes solubles et les formes aggrégées de l'α-synucléine s'accumulant au sein d'inclusions pathologiques intra-cytoplasmiques a été mise en évidence : d'une part *via* l'étude de modèles cellulaires ou animaux surexprimant l'α-synucléine humaine sauvage ou mutée en A53T,

et d'autre part *via* l'analyse de cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson ou d'atrophie multi-systématisée.

En conclusion, l'immunisation à l'aide d'α-synucléine recombinante humaine de souris C57Bl/6S n'exprimant pas de façon endogène cet immunogène déclenche une réponse humorale importante se traduisant par des taux d'anticorps circulants spécifiques élevés. L'IgG AS11, reconnaissant à la fois les formes solubles et aggrégées de l'α-synucléine humaine, a pu être généré par cette stratégie d'immunisation originale consistant à utiliser comme hôtes des souris C57Bl/6S.

Journal of Neuroscience Methods 192 (2010) 268–276

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneumeth

Production of a monoclonal antibody, against human α-synuclein, in a subpopulation of C57BL/6J mice, presenting a deletion of the α-synuclein locus

Anne-Laure J. Mougenot[a,d], Dominique Bétemps[a], Kevin N. Hogeveen[a], Gabor G. Kovacs[b], Latifa Chouaf-Lakhdar[a], Ollivier Milhavet[c], Sylvain Lehmann[c], Stéphane Legastelois[d], Jean-Jacques Pin[e], Thierry G. Baron[a,*]

[a] Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES), Unité Agents Transmissibles Non Conventionnels, 31 Avenue Tony Garnier, 69394 Lyon Cedex 07, France
[b] Institute of Neurology, Medical University of Vienna, AKH 4J, Währinger Gürtel 18-20, 1097 Vienna, Austria
[c] Institut de génétique humaine, CNRS-UPR1142, 141 Rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 5, France
[d] Indicia Biotechnology, 33 Avenue de la Californie, 69600 Oullins, France
[e] Dendritics, Bioparc Laennec, 60 Avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 July 2010
Received in revised form 5 August 2010
Accepted 6 August 2010

Keywords:
α-Synuclein
Antibody
Immunization
Lewy bodies
Parkinson's disease
Prion

ABSTRACT

Analyses using antibodies directed against α-synuclein play a key role in the understanding of the pathologies associated with neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB) and multiple system atrophy (MSA). However, the generation of antibodies against immunogens with significant sequence similarity to host proteins such as α-synuclein is often hindered by host immunotolerance.

In contrast to wild-type C57BL/6J and BALB/c mice immunized with recombinant human α-synuclein, C57BL/6S Δ*snca* mice presenting a natural deletion of the α-synuclein locus, bypassed the immunotolerance process which resulted in a much higher polyclonal antibody response. The native or fibrillized conformation of α-synuclein used as the immunogen did not have an impact on the amounts of specific antibodies in sera of the host. The immunization protocols resulted in the generation of the IgG AS11, raised against fibrillized recombinant human α-synuclein in C57BL/6S Δ*snca* mice. This monoclonal antibody, recognizing an N-terminal α-synuclein epitope, was selected for its specificity and significant reactivity in Western-blot, immunofluorescence and immunohistochemistry assays. The ability of AS11 to detect both soluble and aggregated forms of α-synuclein present in pathological cytoplasmic inclusions was further assessed using analysis of human brains with PD or MSA, transgenic mouse lines expressing A53T human α-synuclein, and cellular models expressing human α-synuclein.

Taken together, our study indicates that novel antibodies helpful to characterize alterations of α-synuclein leading to neurodegeneration in PD and related disorders could be efficiently developed using this original immunization strategy.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

α-Synuclein is a 140 amino-acid neuronal protein predominantly present in synaptic junctions (Kahle et al., 2000). Although primarily a natively unfolded protein soluble in the cytosol (Weinreb et al., 1996), α-synuclein is also able to bind vesicular membranes by forming amphipathic α-helices, supporting its probable physiological role in the regulation of neurotransmitter release. However, α-synuclein is more specially studied for its relevance in understanding sporadic and familial forms of Parkinson's disease (PD) and related neurodegenerative disorders. In fact, point mutations and copy number variations in the gene encoding α-synuclein (*snca*) are associated with inherited forms of PD, thereby establishing a link between alteration and accumulation of this protein and the development of neuropathologies (Polymeropoulos et al., 1997; Singleton et al., 2003). Moreover, α-synuclein has been identified as the major constituent of pathological intra-neuronal Lewy body inclusions (Spillantini et al., 1997), which are characteristic of PD and dementia with Lewy bodies (DLB). It is also the main component of the glial cytoplasmic inclusions present in multiple system atrophy (MSA) (Wakabayashi et al., 1998). The strong α-synuclein-associated immunoreactivity of these abnormal intraneuronal or glial filaments, combined with a substantial loss of neurons is characteristic of synucleinopathies. Thus, antibodies having the ability to detect abnormal α-synuclein inclusions play a

* Corresponding author. Tel.: +33 4 78 72 65 43; fax: +33 4 78 61 91 45.
E-mail address: thierry.baron@anses.fr (T.G. Baron).

0165-0270/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jneumeth.2010.08.010

key role in the understanding of pathological molecular processes leading to neurodegeneration. The production and characterization of several monoclonal antibodies directed against α-synuclein have been previously reported, and have provided useful information about their specificity, sensitivity, and the epitopes recognized (Baba et al., 1998; Choi et al., 2006; Croisier et al., 2006; Duda et al., 2002; Giasson et al., 2000b; Jakes et al., 1999; Perrin et al., 2003; Waxman et al., 2008; Yu et al., 2007). However, producing monoclonal antibodies (mAb) against an endogenous protein such as α-synuclein is often hindered by immunotolerance of the immunized animals, particularly since the amino acid sequence is highly conserved between species. In this study, we have tried to break the immunotolerance process by immunizing a subpopulation of C57BL/6J inbred mice presenting a natural deletion for *snca* (Specht and Schoepfer, 2001) with recombinant human α-synuclein.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

Animal studies described in this report were carried out in our approved experimental facilities (n° A 69 387 081), in accordance with the EC Directive 86/609/EEC for animal experiments and with the approval of the CREEA (Regional Ethical Committee for Animal Experiments).

Human brain samples have been collected in the frame of a prospective community-based cohort study, the Vienna Trans-Danube Aging (VITA) Study, Vienna, Austria. Neuropathological studies within this project have full approval by the responsible ethics committee of the Medical University Vienna/Vienna General Hospital. VITA study participants had to sign an approved informed consent.

2.2. Immunization

In an attempt to promote different presentations of the immunogen, recombinant human α-synuclein (Sigma) (α-syn rec) was pretreated before injection. To promote oligomerized forms of α-synuclein, α-syn rec was subjected to high-salt or acid treatment. (i) α-Synuclein modified under high-salt conditions (α-syn salt) was obtained by incubating α-syn rec in 1 M NaCl 25 mM Tris–HCl pH 7.5 at 37 °C for 1 week (Emadi et al., 2007; Yagi et al., 2005). (ii) The modification of α-synuclein under acidic conditions (α-syn acid) was performed by incubating α-syn rec in 20 mM acetate buffer pH 3.5, for 24 h at 37 °C (Uversky et al., 2001).

During the first immunization protocol, 3 groups of 5 C57BL/6S Δ*snca* (Harlan) presenting a natural deletion for *snca* were immunized with 1 μg of either α-syn rec, α-syn salt or α-syn acid by intra-peritoneal injection. Immunogens were diluted in complete Freund's adjuvant. Twenty-one days later, the second immunization was performed with 1 μg of immunogen in incomplete Freund's adjuvant. The third immunogen administration was given in PBS, 42 days after the beginning of the protocol. The final injection was made with 5 μg in the orbital sinus of mice at day 55. As controls, the same protocol was applied to three groups of five wild-type C57BL/6J mice (Charles River Laboratories).

To estimate the amount of polyclonal antibodies in the sera of immunized mice, blood samples were collected at days 0, 35 and 56. The quantification was achieved by indirect Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) using 96-wells microtiter plates (Maxisorp, Nunc) coated with 1 μg/ml of immunogen (either α-syn rec, or α-syn salt or acid). Sera were diluted in PBS 0.05% Tween 20 and incubated 1 h with shaking, followed by incubation with a HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H + L) antibody ((P.A.R.I.S.) 1:1000). OPD (Sigma) was used as substrate and plates were read at wavelength 450 nm.

Subsequent to this first protocol of immunization, a second protocol including a longer schedule of immunization was performed on three different mouse lines: 4 C57BL/6J, 4 C57BL/6S Δ*snca* and 4 BALB/c. The protocol was performed as previously described, with the following exceptions: injections were made at days 0, 14, 38 and 74. Blood samples were collected at days 0, 29 and 50 to estimate the amounts of circulating antibodies in an indirect ELISA. For this assay, a γ heavy chain specific anti-mouse IgG (Sigma) and a μ chain specific anti-mouse IgM (P.A.R.I.S.) were used.

2.3. Antibody generation

Three C57BL/6S (2 from the first protocol of immunization and 1 from the second) presenting the highest quantities of circulating anti-α-synuclein antibodies were selected for the production of monoclonal antibodies. Mice were euthanized 3 days after the last boost by administration of a lethal dose of sodium pentobarbital. Spleens were taken for obtaining splenocytes and fusion with SP2/0 myeloma cells was performed in presence of polyethylene glycol. Hybridomas were grown in DMEM-F12-Glutamax I medium (Invitrogen) supplemented with 10% horse serum (Gibco), 0.1 mM hypoxanthine and 0.5‰ azaserine in 96-well plates. Hybridomas were screened for the production of anti-α-synuclein antibodies in an indirect ELISA assay on microplates coated with the immunogen. The assay was performed as previously described for the estimation of polyclonal antibody response, with the following exceptions: cell culture supernatants were tested undiluted and TMB was used as a substrate for HRP. The reaction was stopped with HCl 1 N and optical densities were read at 450 nm.

Cloning of positive hybridomas was performed by limiting dilution in 96-well plates. Isotyping of antibodies secreted in cell supernatants was performed by ELISA (Mouse mono Ab-kit(HRP)-Zymed Laboratories Inc.).

To produce large quantities of monoclonal anti-α-synuclein antibody AS11, ascites fluid were produced in BALB/c mice (Charles River Laboratories) treated with pristane (Sigma). Ascites fluid were purified on Affi-gel protein A agarose (BioRad) chromatographic columns. The concentration of purified AS11 antibody was determined by Folin's method (Lowry et al., 1951). Antibody AS11 was conjugated to HRP with the EZ-Link®Plus Activated Peroxydase kit (Pierce).

2.4. Gel electrophoresis and Western-blotting

Immunoreactivity of mAb AS11 was tested in Western-blot for the detection of full-length recombinant N-terminal histidine tagged human α-synuclein (Sigma) and peptides corresponding to (aa 61–140) and (aa 96–140) of human α-synuclein (r-Peptide). Brain protein extracts from C57BL/6S Δ*snca*, wild-type C57BL/6J, and the transgenic line M83 B6; C3H-Tg(*SNCA*)83Vle/J overexpressing A53T human α-synuclein (The Jackson Laboratory) (Giasson et al., 2002) were also tested. Brains from 3-month-old mice were homogenized in 3 ml/g of 50 mM Tris (pH 7.5), 750 mM NaCl, 5 mM EDTA and a cocktail of protease inhibitors (1%). Samples were centrifuged at 100,000 × g for 20 min. Supernatants were diluted in denaturing buffer (4% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 192 mM glycine, 25 mM Tris, 5% sucrose) and heated 5 min at 100 °C before being loaded on 15% gel for SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Proteins were electroblotted onto PVDF membranes (Bio-Rad). Immunodetection was performed either directly with mAb AS11-HRP or with mAb 5C2 (SantaCruz Biotechnology) (1:5000 in PBST for 1 h) followed by incubation with a HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (Pierce). The immunocomplexes were detected with chemiluminescent reagents (ECL Amersham), followed by exposure on Biomax MR Kodak films.

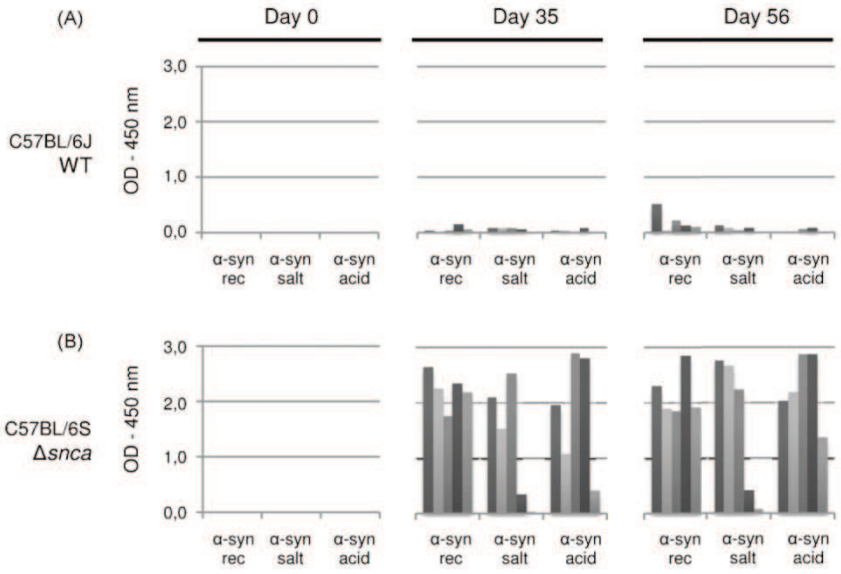


Fig. 1. Total amounts of circulating anti-α-synuclein antibodies in immunized mice. Quantification of polyclonal antibodies in sera of wild-type C57BL/6J (A) and *snca* deleted C57BL/6S (B) mice was performed by indirect ELISA at days 0, 35 and 56 after immunization with either recombinant (α-syn rec) or aggregated α-synuclein (α-syn salt and α-syn acid).

2.5. Neuronal cell cultures and recombinant adeno-associated virus transduction

Murine neuronal stem cells (NSCs) from C57BL6S mice and from the transgenic line M83 were obtained from cerebral cortices of 13.5-day-old embryos as previously described (Kim et al., 2003; Milhavet et al., 2006). Cells were cultured in N2 medium in the presence of 25 ng/ml of basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Abcys). Differentiation of neural progenitors was induced by the withdrawal of bFGF. NSCs were fixed at day 0 and day 6 of differentiation with 4% paraformaldehyde (PFA).

The neuroblastoma cell line SH-SY5Y was maintained in DMEM-F12-Glutamax I medium containing 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin in a 37 °C, 5% CO_2 incubator.

For SH-SY5Y transduction, a recombinant adenoviral genome containing the full length cDNA encoding human WT α-synuclein in frame with a C-terminal myc-His epitope tag was generated by homologous recombination with 200 ng of *SwaI*-linearized VmAd-cDNA3.1 (a generous gift from S. Rusconi, Fribourg – Switzerland) and 600 ng of linearized pcDNA3.1 WT α-synuclein expression construct in chemically competent *Escherichia coli* BJ5183 cells. Products of homologous recombination in BJ5183 cells were analyzed by extensive restriction digest analysis. Positive recombinants were amplified in *E. coli* XL-1 Blue cells, and purified DNA was digested with *PacI*, followed by transfection in HEK-293 cells using calcium phosphate. Cytopathic effect resulting from virus production was observed 8–10 days after transfection. Adenoviruses were extracted by three freeze/thaw cycles and stored in PBS and 10% glycerol. Viral titer was higher than 10^8 plaque-forming units/ml. SH-SY5Y cells were transduced with VmAdcDNA3.1 WT α-syn myc-His at a MOI of 10. Rotenone (100 nM) or DMSO was added to the cells at the time of infection. After 72 h, cells were fixed with 4% PFA and immunofluorescence assays were performed.

2.6. Immunofluorescence

Cells were permeabilized with 10% FBS in PBS containing 0.1% Triton X-100 and primary antibodies were diluted in 10% FBS in PBS for one night at 4 °C. Antibodies were used at the following concentrations: anti-α-synuclein AS11 (1:200), anti-α-synuclein LB509 ((Abcam) 1:250), anti-nestin ((Millipore) 1:500), anti-β-III-tubulin Tuj1 ((Eurogentec) 1:1000), anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) ((Dako) 1:1000) or anti-Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) p26 142 kindly provided by Susan Carpenter (Wannemuehler et al., 1993) (1:200). After washes with PBS-Tween 20 0.05%, cells were incubated with Alexa-Fluor conjugated goat secondary antibodies (Invitrogen) for 30 min. Nuclei were then stained with DAPI ((Sigma) 1:10,000 in PBS) for 5 min.

2.7. Immunohistochemistry on human pathological brains

Anti-α-synuclein antibody AS11 was tested in immunohistochemistry, according to the consensus protocol described by McKeith et al. (2005). Brainstem sections from PD patients and pons of MSA patients were immunostained with AS11 at different dilutions (1:100, 1:500, 1:1000) using different antigen-retrieval methods (boiling in citrate buffer, pH 6, with and without additional 98% formic acid pretreatment of sections for 1 min).

3. Results

3.1. Increased immunoreactivity in mice deleted for snca

During these immunization schedules, three different mouse lines (C57BL/6J, C57BL/6S Δ*snca* and BALB/c) were immunized with recombinant human α-synuclein. In order to compare their capacity to generate a humoral immune response against α-synuclein, the amounts of polyclonal anti-α-synuclein antibodies (pAb) secreted in their sera were followed throughout the immunization protocol. Negligible immune responses were observed in the sera of wild-type C57BL/6J mice during the first immunization protocol, as reflected by the very low amounts of total pAb detected using an anti-IgG (H+L) secondary antibody (Fig. 1A). This result was confirmed during the second immunization schedule, with the detection of low amounts of circulating IgG and IgM in sera of C57BL/6J, using an indirect ELISA with either an γ heavy chain specific anti-mouse IgG or an μ chain specific anti-mouse IgM (Fig. 2A).

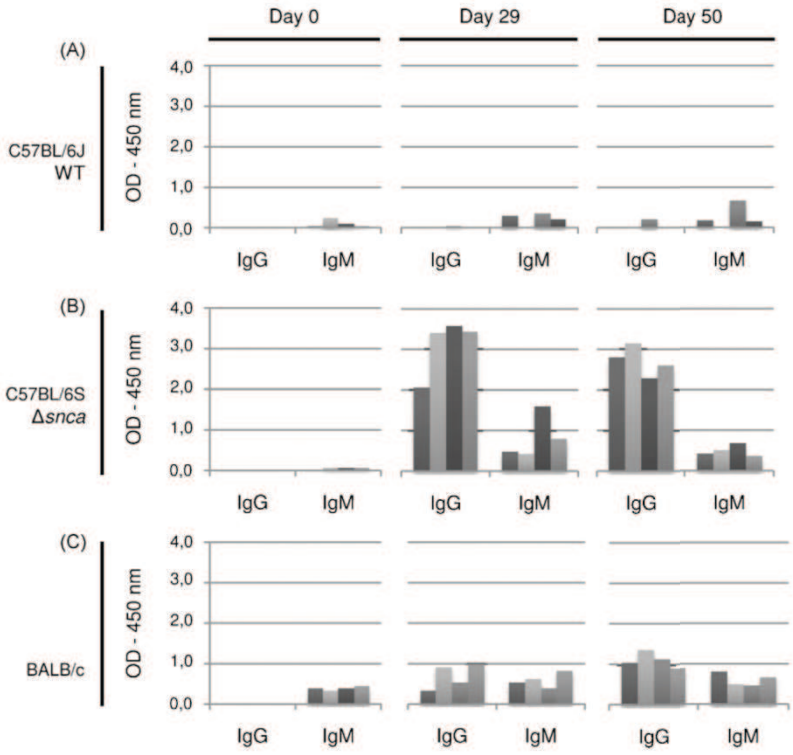


Fig. 2. Amounts of circulating anti-α-synuclein IgG and IgM in three different mouse lines immunized. Quantification of anti-α-synuclein IgG and IgM in sera was achieved by two indirect ELISAs using either a γ specific anti-mouse IgG or a μ specific anti-mouse IgM as secondary antibodies. Blood samples were collected from wild-type C57BL/6J (A), *snca* deleted C57BL/6S (B) and BALB/c (C) mice at days 0, 29 and 50 after immunization with recombinant human α-synuclein.

In contrast, the majority of C57BL/6S Δ*snca* mice had medium or high levels of total circulating polyclonal anti-α-synuclein antibodies (Fig. 1B), consisting primarily of IgG, whereas IgM were moderately present (Fig. 2B). In sera of BALB/c, a mouse line commonly used in the production of monoclonal antibodies, levels of IgG were about two to three times lower than those obtained in C57BL/6S Δ*snca* mice (Fig. 2C). Given these results, the C57BL/6S mice lacking endogenous α-synuclein expression, seemed to be an efficient host to produce anti-α-synuclein antibodies.

Several conformational forms of recombinant human α-synuclein (α-syn salt, α-syn acid or untreated α-syn rec) were used as immunogens during the first immunization assay. The recombinant protein was treated following protocols known to generate oligomerized forms of α-synuclein (Emadi et al., 2007; Uversky et al., 2001; Yagi et al., 2005). The presence of higher molecular weight species of α-synuclein was verified by Western-blot (data not shown). The goal of these treatments was to modify the immunogen in order to increase the immunogenicity of α-synuclein. The ability of α-syn salt, α-syn acid or untreated α-syn rec to trigger the emergence of specific circulating antibodies in the sera of wild-type C57BL/6J or C57BL/6S Δ*snca* was determined by indirect ELISA. These assays demonstrated that the immunogenicity of α-synuclein was not modified by the treatment conditions, and the conformation of the immunogen had little impact on the strength of the immune response (Fig. 1).

3.2. *Production of monoclonal antibody AS11, an IgG directed against human α-synuclein*

Given the results from the study of the influence of the host and immunogen on the immune response, two C57BL/6S from the first immunization schedule presenting high levels of pAb were chosen for fusion. These mice were immunized with recombinant α-synuclein (α-syn rec), or α-synuclein aggregated at low pH (α-syn acid). Hybridomas splenocytes from the C57BL/6S immunized with α-syn rec, gave after cloning and screening in indirect ELISA using an anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, eight clones producing anti-α-synuclein antibodies. The second fusion done with the spleen of a C57BL/6S immunized with α-syn acid, allowed us to obtain 19 other clones producing mAb against α-synuclein. After their selection, each of these 27 monoclonal antibodies was tested in indirect ELISA assays with microplates coated either with α-syn rec or α-syn acid. The type of immunogen used (rec or acid) had no influence on the form of α-synuclein recognized by the mAb in ELISA.

Isotype determination of these 27 anti-α-synuclein mAb showed that only a single antibody was an IgG. The IgG, referred to as AS11 and described in detail in this report, was produced in a C57BL/6S mouse immunized with α-syn acid. The obtaining of numerous IgM led us to perform a new fusion using a C57BL/6S mouse from the second immunization protocol, which was of longer duration, and which may have favored the switch of isotypes from IgM to IgG. Accordingly, the C57BL/6S mouse presenting the highest ratio of circulating anti-α-synuclein IgG/IgM was selected for the third fusion. Contrary to the indirect ELISA with an anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody used for hybridoma screening of the two first fusions, two different tests allowing the specific discrimination of IgG and IgM were used to screen hybridomas from the third fusion. This double screening assay led to the selection of 13 hybridomas producing IgM whereas no hybridoma producing IgG could be detected.

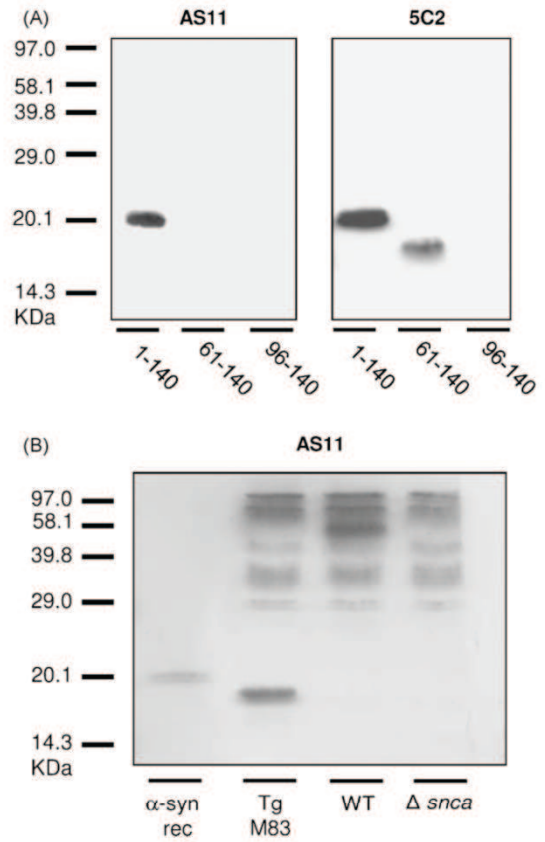


Fig. 3. Western-blot analysis using the anti-α-synuclein antibody AS11. (A) Western-blot analysis of the epitope recognized by AS11 using synthetic peptides (61–140 and 96–140) and recombinant full-length α-synuclein (1–140). The commercial antibody 5C2 recognizing amino-acids 61–95 was used as a positive control. (B) Western-blot immunodetection of recombinant histidine tagged human α-synuclein (α-syn rec) and cerebral α-synuclein extracted from transgenic mouse line M83 (TgM83) using HRP-conjugated AS11. AS11-HRP failed to detect endogenous murine α-synuclein expressed at an endogenous level in C57BL/6J line (WT). AS11-HRP immunoreactive species present in brain extracts from C57BL/6S (Δ*snca*) confirm that the higher molecular weight bands are non-specific.

3.3. Detection of α-synuclein in Western-blot using HRP-conjugated AS11

Antibody AS11-HRP detected recombinant full-length human α-synuclein with an apparent molecular weight of ~20 kDa in Western-blot. Peptides (61–140) and (96–140) of α-synuclein were not detected by AS11, demonstrating that the N-terminal region of α-synuclein (1–60) was necessary for the recognition of AS11. As a control, full-length α-synuclein and peptides corresponding to (aa 61–140) and (aa 96–140) of human α-synuclein were detected by 5C2, a human α-synuclein NAC (Non-Amyloid Component) domain specific IgG (epitope (aa 61–95)). As expected, antibody 5C2 recognized both the full-length protein, and the peptide corresponding to (aa 61–140) of human α-synuclein, but failed to detect the C-terminal peptide (aa 96–140) (Fig. 3A).

Soluble human A53T α-synuclein extracted from brains of 3-month-old asymptomatic mice of transgenic line M83, could be detected in Western-blot by AS11-HRP. In contrast, no band corresponding to endogenous murine α-synuclein could be detected in C57BL/6J brain extracts at this dilution. Thus, AS11 was able to recognize recombinant wild-type or A53T human α-synuclein, but failed to detect endogenous murine α-synuclein. Moreover, no band corresponding to α-synuclein was detected in cerebral extracts of α-synuclein deleted mouse. It should be noted however, that several non-specific bands of high molecular weight were present in all samples tested (Fig. 3B).

3.4. Specific detection of α-synuclein in neuronal cell-cultures by mAb AS11

Undifferentiated murine NSC derived from line M83 overexpressing human A53T α-synuclein were strongly detected by an antibody directed against nestin, a neuronal precursor specific protein (Fig. 4A). On the other hand, only weak immunostainings of β-III-tubulin (neuron specific) and GFAP (astrocyte specific), were observed at day 0 of differentiation (Fig. 4C). After 6 days of differentiation, cells were negative for nestin (Fig. 4B), consistent with the appearance of numerous neuronal and astrocytic cell types (Fig. 4D). Immunostaining of A53T human α-synuclein by antibody AS11 in NSCs derived from the transgenic line M83, was apparent at day 0 of differentiation (Fig. 4E). At day 6, mAb AS11 underlined the thin prolongations of neurons (Fig. 4F). In contrast, staining with mAb AS11 was absent at all stages of differentiation in cells derived from C57BL/6S Δ*snca* (Fig.s 4G and 4H), thus demonstrating the specificity of this antibody.

AS11 could detect cytoplasmic α-synuclein in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y (Fig. 5A), and generated a stronger and finer staining than the commercially available anti-human α-synuclein mAb LB509 (Fig. 5B). The absence of immunostaining of SH-SY5Y cells with an irrelevant antibody (anti-BIV) was used as negative control (Fig. 5C). Moreover, strong immunofluorescence with mAb AS11 was observed in SH-SY5Y cells transduced with recombinant adeno-associated viruses designed to overexpress human wild-type α-synuclein (rAAV α-syn WT) (Fig. 5D). Interestingly, AS11 was able to detect perinuclear inclusions containing aggregated α-synuclein in rAAV Δsyn WT transduced cells treated with 100 nM rotenone for 72 h (Fig. 5E). Similar aggresomes enriched in α-synuclein were detected with LB509 (Fig. 5F).

3.5. Immunohistochemical staining of pathological human brains by AS11

Intraneuronal inclusions (Lewy bodies) and Lewy neurites rich in fibrillized α-synuclein were accurately stained by AS11 in brainstem sections from patients with PD. Similarly, pathological glial cytoplasmic inclusions mainly found in oligodendrocytes in the pons of patients with MSA were specifically marked by AS11 (Fig. 6). The optimal working dilution was 1:500 with combined pretreatment of tissue with citrate buffer and formic acid prior to incubation with the primary antibody.

4. Discussion

The aim of this study was to evaluate the efficiency of several immunization pathways in the generation of monoclonal antibodies against α-synuclein. The production of several monoclonal α-synuclein antibodies has already been reported (Baba et al., 1998; Choi et al., 2006; Croisier et al., 2006; Duda et al., 2002; Giasson et al., 2000b; Jakes et al., 1999; Perrin et al., 2003; Waxman et al., 2008; Yu et al., 2007), but very few of these studies describe in detail the protocols and the hosts used for immunization. Nonetheless, these features deserve to be considered since the well conserved amino-acid sequence of α-synuclein increases the difficulty of producing antibodies in hosts expressing a similar endogenous protein. The primary amino acid sequences of human and murine α-synuclein share 95.3% homology (Lavedan, 1998), which likely hinders the recognition of the recombinant

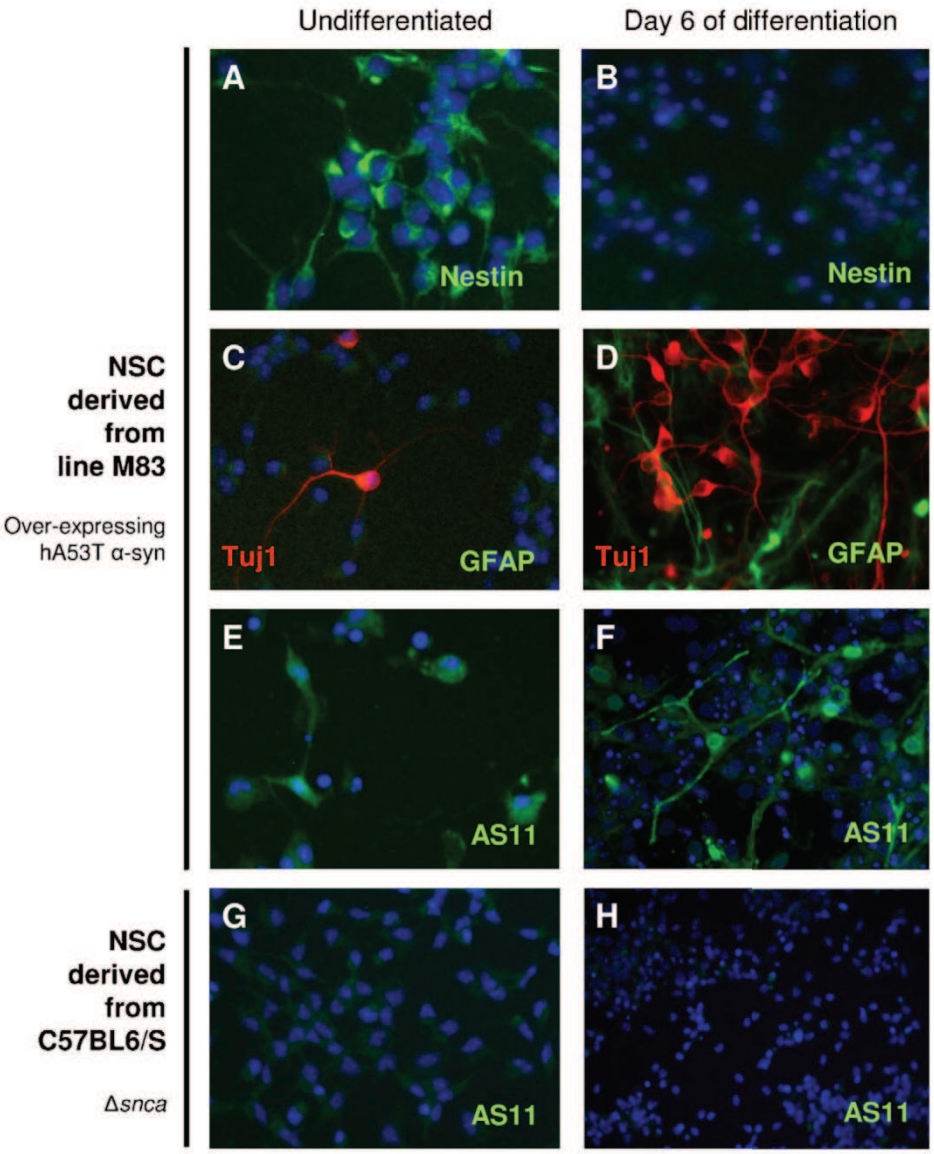


Fig. 4. Immunofluorescence of murine neural stem cells (NSC). NSC were obtained from cerebral cortices of 13.5-day-old embryos of transgenic mice over-expressing human A53T α-synuclein (line M83) (A–F) and C57BL6S Δ*snca* (G and H). NSC were fixed at an undifferentiated state (day 0) (A, C, E and G), or after 6 days of differentiation (B, D, F and H).

human α-synuclein immunogen as a non-self protein. Similar difficulties in producing antibodies against the prion protein have been previously described. However, this issue, associated with host immunotolerance, had been bypassed by immunizing prion protein knock-out mice ($PrP^{0/0}$) (Bueler et al., 1992) with pathological prion proteins from scrapie (PrP^{sc}) (Betemps and Baron, 2001; Prusiner et al., 1993). We therefore decided to generate anti-α-synuclein antibodies by immunizing a subpopulation of C57BL/6S mice presenting a natural deletion of the α-synuclein locus with the recombinant human protein. In contrast to wild-type C57BL/6J and BALB/c mice, immunization of the α-synuclein-null C57BL/6S line resulted in very high amounts of circulating antibodies, mainly consisting of IgG. Even the BALB/c mice, commonly used in the production of monoclonal antibodies, presented amounts of circulating IgG two or three times lower than the ones obtained with the C57BL/6S line. These results suggest that the natural deletion of *snca* in the C57BL/6S host allowed the recognition of the immunogen as a non-self protein thus generating a strong polyclonal immune response.

Following the first immunization protocol, an indirect ELISA assay using an anti-IgG (H+L) secondary antibody was used to quantify amounts of circulating pAb, and to screen hybridomas. These assays led to the selection of a single IgG (antibody AS11) among a very large proportion of anti-α-synuclein IgM antibodies. Indeed, since light chains are shared by all immunoglobulin classes, an anti-IgG (H+L) secondary antibody may also recognize other immunoglobulins including IgM. In an attempt to avoid such a cross-reaction, a double screening was performed for the second immunization protocol, using a γ heavy chain specific anti-mouse IgG antibody and a μ heavy chain specific anti-mouse IgM antibody. Thus, this double-titration of anti-α-synuclein pAb highlighted that the rates of circulating IgG were five times greater than those of

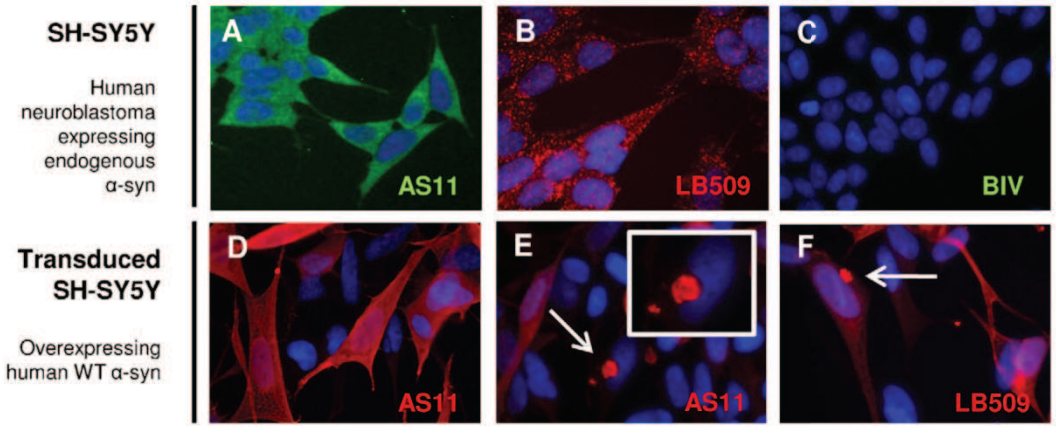


Fig. 5. α-Synuclein associated immunofluorescence in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Immunostaining was performed with anti-α-synuclein antibodies AS11 (A) and LB509 (B). An anti-BIV antibody was used as negative control (C). mAb AS11 immunolabelling of SH-SY5Y cells transduced with an adenoviral vector over-expressing human wild-type α-synuclein (D). After intoxication with rotenone (100 nM – 72 h), some transduced cells present pathological intracytoplamic inclusions rich in α-synuclein stained by mAb AS11 (E) and by LB509 (F).

IgM in sera of C57BL/6S. Nevertheless, after the splenocytes fusion of the C57BL/6S mouse presenting the highest ratio of circulating IgG/IgM, we managed to produce only IgM secreting clones, failing to generate any secreting IgG. The duration (58 days for the first protocol and 75 days for the second) and the number of boosts (4) done during our immunization protocols should have allowed class switching from IgM to IgG. Although the reasons for the large proportion of IgM still remain unclear, they seem to be associated with the fusion or cloning steps, rather than the immunization protocols. Similar difficulties were previously mentioned (Williamson et al., 1996) during studies to generate monoclonal antibodies against the prion protein. In that study, serum IgG titers against human PrP were detected after immunization of $PrP^{0/0}$ knock-out mice with PrP^{sc}, but they failed to establish stable hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against PrP. The level of PrP expression in the myeloma cell line used for fusion might possibly be a limiting element for the survival of hybrid clones producing monoclonal anti-PrP antibodies.

In our immunization strategies, the conformation of the recombinant human α-synuclein did not seem to have an influence on its immunogenicity. When compared to untreated α-synuclein, the treatments of immunogen in high-salt or acidic conditions to promote the formation of α-synuclein fibrils did not increase the amount of α-synuclein antibodies in the sera of immunized mice. Qualitatively, it was much more difficult to evaluate the exact impact of immunogen conformation on the epitope recognized by antibodies generated. However, we noticed that immunizations of C57BL/6S with untreated recombinant α-synuclein versus an aggregated antigen did not lead to the selection of antibodies with specificity for one or the other of these two forms.

We next focused on the characterization of AS11, the anti-α-synuclein IgG generated by immunizing C57BL/6S mice with recombinant human α-synuclein fibrillized under acidic conditions. These studies aimed to provide functional information for the use of mAb AS11 as a tool to detect α-synuclein in Western-blot, immunofluorescence and immunohistochemical assays.

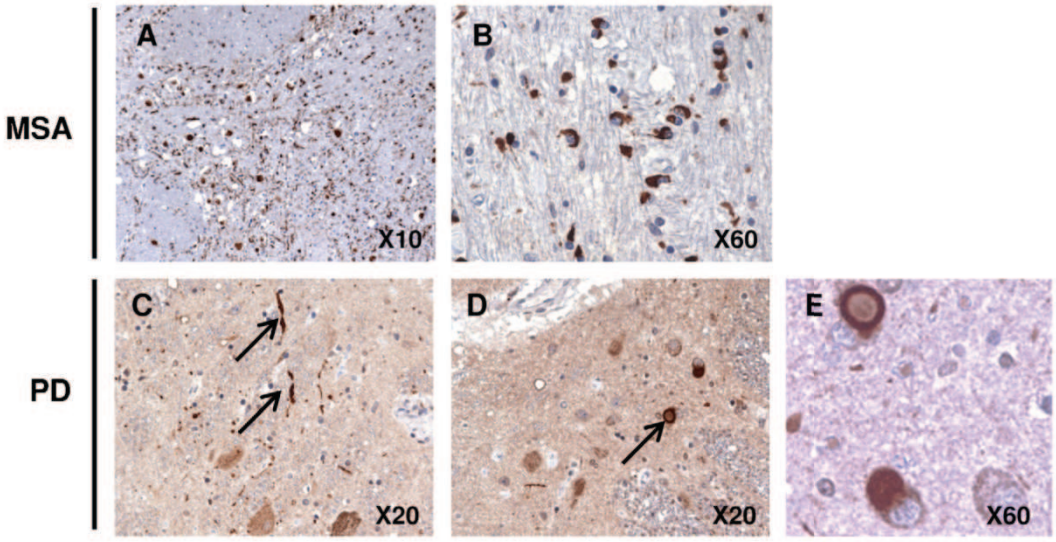


Fig. 6. Immunohistochemical analysis of pathological human brains with synucleinopathies. mAb AS11 detected glial cytoplasmic inclusions in the pons of patients with multiple system atrophy (MSA) (A and B). Lewy neurites (C) and Lewy bodies (D and E) containing fibrillized α-synuclein were specifically stained by AS11 in the locus coeruleus from an individual with Parkinson's disease (PD).

By Western-blot analysis, the antibody AS11 could detect both recombinant wild-type α-synuclein and cerebral A53T α-synuclein extracted from young, asymptomatic transgenic mice over-expressing the A53T mutated human transgene (Giasson et al., 2002). In contrast, no band corresponding to α-synuclein was detected by AS11 in cerebral extracts from the C57BL/6S Δ*snca* line, proving the specificity of this antibody. The specificity of AS11 was also supported by immunofluorescence assays performed on neuroblastoma cell lines and NSCs. In fact, the expression of human α-synuclein in SH-SY5Y and NSCs derived from mice over-expressing A53T α-synuclein was associated with a diffuse cytoplasmic immunostaining of α-synuclein by AS11. No staining was observed in NSCs derived from C57BL/6S Δ*snca* mice. Moreover, these Western-blot and immunofluorescence assays also demonstrated the ability of antibody AS11 to detect both cerebral α-synuclein under denaturing conditions and cytoplasmic α-synuclein in neuronal cell cultures.

The characterization of murine NSCs over-expressing human A53T α-synuclein allowed us to describe expression of the transgene under the control of the PrP promoter. Monoclonal antibody AS11 immunostained human A53T mutated α-synuclein in undifferentiated cultures, also labeled by nestin, a marker of precursors cells of the nervous system. This expression of the α-synuclein transgene in undifferentiated NSCs taken from 13.5-day-old embryos of line M83 was expected since transcripts of the murine PrP gene are detectable in the developing brain and spinal cord by 13.5 dpc (Manson et al., 1992). Moreover, low but detectable amounts of cellular PrP (PrP^c) were previously described in undifferentiated NSCs derived from 13.5-day-old embryos of CD1 mice (Milhavet et al., 2006). As with the prion protein, murine α-synuclein is also expressed in the early stages of embryonic development and can be detected immunohistochemically from day 9.5 until the end of gestation (Zhong et al., 2009). In our NSCs cultures after 6 days of differentiation, we observed that α-synuclein was predominantly present in β-III-tubulin-positive neurons. Alongside this population of neurons, some cells expressing the astrocytic marker GFAP could also be detected by immunofluorescence.

As demonstrated by our immunohistochemical studies, antibody AS11 could also be used as a diagnostic tool. To date, the definitive diagnosis of synucleinopathies remains based on post-mortem analysis, underlying the need to have specific and sensitive antibodies able to detect α-synuclein in embedded brain sections. The glial cytoplasmic inclusions found in the pons, composed of filamentous, insoluble α-synuclein stained by antibody AS11, are recognized as a defining morphological feature of MSA (Dickson et al., 1999). Antibody AS11 can also be used for the definitive diagnosis of PD by labelling Lewy bodies and Lewy neurites, which are intracellular proteinaceous inclusions mostly composed of polymers of fibrillized α-synuclein (Baba et al., 1998).

Finally, using cellular and mouse models, we have demonstrated that antibody AS11 was able to detect several forms of α-synuclein. Both soluble human wild-type (in SH-SY5Y) and A53T α-synuclein (in asymptomatic brains of mouse transgenic line M83) were recognized by AS11. In addition, it was shown that AS11 could also bind pathological filamentous forms of the protein in human disease brains or in SH-SY5Y cells over-expressing recombinant WT human α-synuclein following treatment with rotenone. A previous study highlighted the selection of three mAbs (Syn 505, Syn 506 and Syn 514) that had the ability to detect aggregated α-synuclein in pathological inclusions (Duda et al., 2002; Giasson et al., 2000a; Waxman et al., 2008). These antibodies preferentially recognized N-terminal epitopes in complex conformations (Waxman et al., 2008) that could possibly be connected to the pathological changes of α-synuclein occurring during its fibrillization. Western-blot analysis with synthetic peptides demonstrated that antibody AS11 also recognized an epitope in the N-terminal region of α-synuclein (aa 1–60). Moreover, like antibody AS11 which was raised against fibrillized α-synuclein, the antibodies Syn 505, Syn 506 and Syn 514 were all generated against oxidized/nitrated forms of recombinant α-synuclein that mimicked pathological species of the protein (Duda et al., 2002; Giasson et al., 2000a; Waxman et al., 2008). Nevertheless, as previously mentioned, it remains difficult to understand the manner in which modifications of the immunogen conformation could influence the recognition antibodies patterns. Although it is unknown in our experiments what is the respective influence of the immunization of α-synuclein deleted mice or/and the fibrillized presentation of recombinant α-synuclein used as immunogen, it is noteworthy that the AS11 antibody recognizes an N-terminal epitope. Whereas most human-specific antibodies recognize the more divergent C-terminal part of the protein, this emphasizes that our strategy could usefully allow to expand the panel of available monoclonal antibodies.

In conclusion, a strong immune response against α-synuclein could be raised by immunizing C57BL/6S mice deleted for *snca*. Immunoglobulin G AS11 was selected for its significant specificity and reactivity in techniques commonly used to study and describe pathological alterations of α-synuclein in neurodegenerative disease such as PD, MSA or DLB. Antibody AS11 could serve as a sensitive probe for detection of α-synuclein in Western-blot, immunohistochemistry and immunofluorescence assays.

Acknowledgments

We gratefully thank Alain Dorier for his expertise in antibody production and Emilie Antier for performing immunization and animal care. We also want to thank Véronique Métayer, Caroline Seinera and Marjorie Ducreux for their great technical assistance and Bénédicte Berger for helpful discussions.

A.-L.J.M. was supported by a training grant (CIFRE 2006/1050) from the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie).

References

Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, et al. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Am J Pathol 1998;152:879–84.

Betemps D, Baron T. Molecular specificities of antibodies against ovine and murine recombinant prion proteins. Biochem Biophys Res Commun 2001;281:101–8.

Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature 1992;356:577–82.

Choi JY, Park HJ, Seong YM, Choi EY, Min BR, Rhim H. Fine epitope mapping of monoclonal antibodies specific to human alpha-synuclein. Neurosci Lett 2006;397:53–8.

Croisier E, MRes DE, Deprez MR, Goldring M, Dexter K, Pearce DT, et al. Comparative study of commercially available anti-alpha-synuclein antibodies. Neuropathol Appl Neurobiol 2006;32:351–6.

Dickson DW, Liu W, Hardy J, Farrer M, Mehta N, Uitti R, et al. Widespread alterations of alpha-synuclein in multiple system atrophy. Am J Pathol 1999;155:1241–51.

Duda JE, Giasson BI, Mabon ME, Lee VM, Trojanowski JQ. Novel antibodies to synuclein show abundant striatal pathology in Lewy body diseases. Ann Neurol 2002;52:205–10.

Emadi S, Barkhordarian H, Wang MS, Schulz P, Sierks MR. Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity. J Mol Biol 2007;368:1132–44.

Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, et al. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. Science 2000a;290:985–9.

Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. Neuron 2002;34:521–33.

Giasson BI, Jakes R, Goedert M, Duda JE, Leight S, Trojanowski JQ, et al. A panel of epitope-specific antibodies detects protein domains distributed throughout human alpha-synuclein in Lewy bodies of Parkinson's disease. J Neurosci Res 2000b;59:528–33.

Jakes R, Crowther RA, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T, Goedert M. Epitope mapping of LB509, a monoclonal antibody directed against human alpha-synuclein. Neurosci Lett 1999;269:13–6.
Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, et al. Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. J Neurosci 2000;20:6365–73.
Kim JH, Panchision D, Kittappa R, McKay R. Generating CNS neurons from embryonic, fetal, and adult stem cells. Methods Enzymol 2003;365:303–27.
Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680–5.
Lavedan C. The synuclein family. Genome Res 1998;8:871–80.
Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265–75.
Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? Development 1992;115:117–22.
McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB consortium. Neurology 2005;65:1863–72.
Milhavet O, Casanova D, Chevallier N, McKay RD, Lehmann S. Neural stem cell model for prion propagation. Stem Cells 2006;24:2284–91.
Perrin RJ, Payton JE, Barnett DH, Wraight CL, Woods WS, Ye L, et al. Epitope mapping and specificity of the anti-alpha-synuclein monoclonal antibody Syn-1 in mouse brain and cultured cell lines. Neurosci Lett 2003;349:133–5.
Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science 1997;276:2045–7.
Prusiner SB, Groth D, Serban A, Koehler R, Foster D, Torchia M, et al. Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:10608–12.
Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science 2003;302:841.
Specht CG, Schoepfer R. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. BMC Neurosci 2001;2:11.
Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature 1997;388:839–40.
Uversky VN, Li J, Fink AL. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. J Biol Chem 2001;276:10737–44.
Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. Neurosci Lett 1998;249:180–2.
Wannemuehler Y, Isaacson J, Wannemuehler M, Wood C, Roth JA, Carpenter S. In vitro detection of bovine immunodeficiency-like virus using monoclonal antibodies generated to a recombinant gag fusion protein. J Virol Methods 1993;44:117–27.
Waxman EA, Duda JE, Giasson BI. Characterization of antibodies that selectively detect alpha-synuclein in pathological inclusions. Acta Neuropathol 2008;116:37–46.
Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury Jr PT. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. Biochemistry 1996;35:13709–15.
Williamson RA, Peretz D, Smorodinsky N, Bastidas R, Serban H, Mehlhorn I, et al. Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:7279–82.
Yagi H, Kusaka E, Hongo K, Mizobata T, Kawata Y. Amyloid fibril formation of alpha-synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins: implications for the mechanism of transmissible conformational diseases. J Biol Chem 2005;280:38609–16.
Yu S, Li X, Liu G, Han J, Zhang C, Li Y, et al. Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. Neuroscience 2007;145:539–55.
Zhong SC, Luo X, Chen XS, Cai QY, Liu J, Chen XH, et al. Expression and subcellular location of alpha-synuclein during mouse-embryonic development. Cell Mol Neurobiol 2009.

II. Transmission de souches de prion à des souris transgéniques surexprimant l'α-synucléine humaine mutée en A53T

Résumé des résultats publiés dans Journal of Neuropathology and Experimental Neurology

Un intérêt croissant est porté à la compréhension des éventuelles interactions qui existeraient entre diverses protéines neuronales mal-conformées et impliquées dans la pathogénèse des maladies neurodégénératives. Dans ce contexte, nous avons inoculé par voie intra-cérébrale des homogénats de cerveaux contenant différentes souches de prion à des souris transgéniques TgM83 qui développent, au cours de leur vieillissement, une synucléinopathie liée à la surexpression d'α-synucléine humaine mutée en A53T.

Les médianes des durées d'incubation de la tremblante classique C506M3 et de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine classique (ESB-C) après inoculation à des souris TgM83 sont significativement raccourcies par rapport à celles observées suite à la transmission de ces mêmes souches de prion à des souris sauvages C57Bl/6. Toutes les souris TgM83 inoculées avec des homogénats de cerveaux infectés par la tremblante C506M3 ou par l'ESB-C meurent de maladie à prion avant d'avoir eu le temps de développer des formes insolubles et phosphorylées en sérine 129 de l'α-synucléine, lesquelles sont les marqueurs moléculaires d'un stade avancé de synucléinopathie.

Si les souris TgM83 inoculées avec de l'ESB-H meurent précocément par rapport à des souris sauvages C57Bl/6 infectées dans les même conditions, leur durée de survie n'est pas significativement différente de celle de souris témoins TgM83 n'ayant pas été inoculées. Autrement dit, l'inoculation d'ESB-H (qui est une souche de prion plus « lente ») à des souris TgM83 ne raccourcit pas le temps de survie de ces souris qui développent alors toutes des altérations moléculaires de l'α-synucléine. De plus, la présence de ces formes insolubles et phosphorylées de l'α-synucléine est couplée à l'accumulation de PrPd dans les cerveaux des quatre dernières souris TgM83 appartenant à ce groupe expérimental inoculé avec de l'ESB-H.

En définitive, cette étude montre que l'inoculation intra-cérébrale d'ESB-H à des souris TgM83 surexprimant la forme mutée en A53T de l'α-synucléine humaine, permet de déclencher,

chez les souris les plus tardives de la cohorte, une maladie à prion aux côtés d'une synucléinopathie manifeste.

J Neuropathol Exp Neurol
Copyright © 2011 by the American Association of Neuropathologists, Inc.

Vol. 70, No. 5
May 2011
pp. 377–385

ORIGINAL ARTICLE

Transmission of Prion Strains in a Transgenic Mouse Model Overexpressing Human A53T Mutated α-Synuclein

Anne-Laure J. Mougenot, Anna Bencsik, PhD, Simon Nicot, Johann Vulin, Eric Morignat, Jérémy Verchère, Dominique Bétemps, PhD, Latefa Lakhdar, PhD, Stéphane Legastelois, PhD, and Thierry G. Baron, PhD, DVM

Abstract

There is a growing interest in the potential roles of misfolded protein interactions in neurodegeneration. To investigate this issue, we inoculated 3 prion strains intracerebrally into transgenic (TgM83) mice that overexpress human A53T α-synuclein. In comparison to nontransgenic controls, there was a striking decrease in the incubation periods of scrapie, classic and H-type bovine spongiform encephalopathies (C-BSE and H-BSE), with conservation of the histopathologic and biochemical features characterizing these 3 prion strains. TgM83 mice died of scrapie or C-BSE prion diseases before accumulating the insoluble and phosphorylated forms of α-synuclein specific to late stages of synucleinopathy. In contrast, the median incubation time for TgM83 mice inoculated with H-BSE was comparable to that observed when these mice were uninfected, thereby allowing the development of molecular alterations of α-synuclein. The last 4 mice of this cohort exhibited early accumulations of H-BSE prion protein along with α-synuclein pathology. The results indicate that a prion disease was triggered concomitantly with an overt synucleinopathy in some transgenic mice overexpressing human A53T α-synuclein after intracerebral inoculation with an H-BSE prion strain.

Key Words: α-Synuclein, Bovine spongiform encephalopathy, Prion, Scrapie.

INTRODUCTION

Accumulation of misfolded proteins is assumed to play a key role in the pathogenesis of many neurodegenerative disorders. The molecular pathway leading to synaptic dysfunction and neuronal death involves conformational changes in proteins that adopt β-sheet structures that are prone to oligomerization (1). The oligomers self-associate into toxic fibrils, which tend to become insoluble and protease-resistant, thereby generating aggregates that the proteolysis system fails to eliminate (2). This saturation of the cellular clearance system activates the apoptotic pathways that lead to major dysfunction and ultimately to cell death (3–6).

Among these protein-misfolding disorders, the transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are distinguishable from others by the fact that they can be transmitted between individuals and across species. The misfolded and aggregated form of prion protein (PrPd for disease-associated prion protein) is now accepted to be the major, if not the only, component that propagates these diseases by inducing the conversion of the normal host prion protein (PrPc) into its pathological conformer (7). Transmission studies in mice are widely used to characterize prion strains, which are defined by the mean incubation periods, the distribution and the intensity of the brain vacuolar lesions, the distribution and the type of PrPd, as well as the specific molecular pattern of PrPd (8–12).

In Parkinson disease (PD), the main protein involved in the pathological events causing neurodegeneration is α-synuclein. Point mutations and copy number variations in the gene encoding α-synuclein (*snca*) are associated with inherited forms of PD, thereby establishing a link between alterations and accumulation of this protein and the onset of disease (13–18). Moreover, fibrillized α-synuclein has been identified as the major constituent of intraneuronal aggregates, that is, "Lewy bodies" (19, 20). These inclusions rich in filamentous α-synuclein, combined with a substantial loss of neurons in the substantia nigra pars compacta, are hallmark lesions of PD.

However, as suggested by the overlap in the pathological and clinical features of patients with protein misfolding disorders (21, 22), the relationships between "α-synuclein alterations and PD" and between "PrPd and prion diseases" are not exclusive. Indeed, various misfolded neuronal proteins are present alongside α-synuclein in the brains of patients with PD (23). Conversely, pathological forms of α-synuclein can be detected concomitantly with PrPd in TSEs of humans (Creutzfeldt-Jakob disease [CJD]) or animals (scrapie) (22, 24–26). These findings raise questions about potential common mechanisms in the pathogenesis of prion and α-synuclein disorders.

The goal of this study was to provide a model of prion disease in mice prone to the development of a synucleinopathy. For this purpose, 3 different prion strains were transmitted by intracerebral (i.c.) inoculation into transgenic TgM83 mice that develop a motor phenotype during aging that is associated with the overexpression of human A53T mutated α-synuclein.

From the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail – ANSES (A-LJM, AB, SN, JV, EM, JV, DB, LL, TGB), Lyon; and Indicia Biotechnology (A-LJM, SL), Oullins, France.

Send correspondence and reprint requests to: Thierry G. Baron, PhD, DVM, ANSES, 31 Avenue Tony Garnier, 69394 Lyon cedex 07, France; E-mail: thierry.baron@anses.fr

A.-L. J. M. was supported by a training grant (CIFRE 2006/1050) from the ANRT, Paris, France (Association Nationale pour la Recherche et la Technologie).

MATERIALS AND METHODS

Transgenic Mice and Prion Inoculation

For this study, we used a transgenic mouse model of synucleinopathy, that is, line TgM83, that overexpresses human A53T α-synuclein (B6; C3H-Tg[SNCA]83Vlc/J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) (27). We have observed that TgM83 mice spontaneously develop a dramatic motor phenotype between 10 and 22 months of age. At the end of life, TgM83 mice present characteristic clinical symptoms due to the α-synuclein pathology, including weight loss, reduced ambulation, severe motor impairment, prostration, and partial hind limb paralysis with overall stiffness of the hind legs and tail. The mice become unable to recover when placed on their back. We inoculated 6-week-old homozygous TgM83 mice (anesthetized by isoflurane inhalation) i.c. with 20 µl of 1% brain homogenates obtained from wild-type (wt) C57BL/6 mice with prion diseases (scrapie strain C506M3, classic bovine spongiform encephalopathy [C-BSE], or H-type BSE [H-BSE] [28, 29]). Nontransgenic C57BL/6 control mice (Charles River, L'Arbresle, France) were inoculated i.c. with the same prion strains. B6C3H mice (Charles River), which constituted the genetic background of the TgM83 mouse model, were also inoculated with the C-BSE strain at 1%. Age-matched control TgM83 mice that had not been inoculated with prions were killed either at 7 months of age (before the onset of clinical signs related to α-synuclein alterations), or at 14 months of age, after developing a severe motor phenotype due to synucleinopathy (27). The animals were cared for and housed in our approved experimental facilities (no. A 69 387 081), in accordance with the EC Directive 86/609/EEC for animal experiments and with the CREEA (Regional Committee for Ethical Experimentation on Animals—protocol no. 98). The mice were supplied with food and drink ad libitum and checked at least twice a week. Once they showed clinical signs, the animals were monitored daily and killed by administration of a lethal dose of sodium pentobarbital. The brains were removed, and one half was frozen and stored at −80°C for Western blot analyses and the other half was fixed in buffered formalin solution (10%, pH 7.4) for histopathologic analyses.

Extraction of PrP^{res}

The extraction methods used to identify and characterize the proteinase K (Roche, Meylan, France)–resistant prion protein (PrP^{res}) from mouse brains have been previously described (8, 29). Briefly, 20% brain homogenates were prepared in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA). Proteinase K was added at a concentration of 10 µg per 100 mg of brain tissue, and samples were incubated at 37°C for 1 hour. *N*-lauroylsarcosyl (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was added at a final concentration of 10%, and samples were then centrifuged at 465,000 × *g* for 2 hours over a 10% sucrose cushion. The pellet was resuspended in 50 µl of denaturing buffer TD4215 (4% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 192 mM glycine, 25 mM Tris, 5% sucrose). In some experiments, deglycosylation was performed using PNGase F (P07043; Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Samples of PrP^{res} in TD4215 (1–2 µl) were mixed with denaturing buffer from the PNGase kit, G7 buffer, NP40, and PNGase according to the manufacturer's instructions. After incubation at 37°C for 1 hour, samples were ready for Western blot analysis after appropriate dilutions in TD4215 buffer.

Extraction of α-Synuclein

About 20% brain homogenates were prepared in high-salt buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 750 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT) containing 1% phosphatase (ref 78428; Fischer Scientific, Illkirch, France) and protease (P2714; Sigma) inhibitor cocktails. Samples were centrifuged at low speed (1,000 × *g* for 5 minutes at +4°C). About 200 µl of supernatants was incubated in *N*-lauroylsarcosyl at a final concentration of 10% before being ultracentrifuged at 465,000 × *g* (1 hour at +4°C) over a 10% sucrose cushion. The pellets (detergent-insoluble/SDS-soluble fraction) were resuspended in 50 µl of TD4215 buffer.

Western Blot Analysis

After heat denaturation for 5 minutes at 100°C in TD4215 buffer, proteins from the brain extracts were separated by electrophoresis using 15% SDS–polyacrylamide gels before being electroblotted onto poly vinylidene fluoride membranes (BioRad, Marnes La Coquette, France). Immunodetection of prion was performed with mouse monoclonal antibodies (mAb) Sha 31 (1:10 in PBST) (BioRad), 12B2 (340 ng/ml), or SAF 84 (500 ng/ml) (SPI-Bio, Montigny Le Bretonneux, France), respectively, directed against (144-WEDRYYRE-151), (88-WGQGG-92), and (163-RPVDQY-168) murine PrP sequences. α-Synuclein was probed with a rabbit mAb that only detects human α-synuclein phosphorylated on serine 129 (Pser129) (1:1000) (ref ab51253; Abcam, Cambridge, UK). The amount of proteins loaded on each lane was assessed by detection of GAPDH using a mouse mAb (1:10,000) (Millipore, Molsheim, France). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase–conjugated goat anti-mouse (BioRad for Sha31 and ref 32430 [Fischer Scientific] for the other mouse mAb) or anti-rabbit (ref 32460; Fischer Scientific) secondary antibodies. The immunocomplexes were visualized with chemiluminescent reagents (ECL; GE Healthcare, Orsay, France), followed by exposure on Biomax MR Kodak films, or by analysis using the Versa Doc system and Quantity One software (both from BioRad). The apparent molecular weights were measured by comparing the positions of the bands with a biotinylated marker (B2787; Sigma) and the glycoform ratios of the PrP^{res} polypeptides were expressed as mean percentages (±SD) of the total signal for the 3 PrP^{res} glycoforms.

Lesion Profiles and Immunohistochemistry

After standard paraffin embedding, 5-µm brain sections were prepared. The slides were dewaxed then stained for either histopathologic or immunohistochemical examination. Slides stained with hematoxylin and eosin were evaluated for vacuolar lesions. Lesion profiles were determined according to Fraser and Dickinson's (30) lesion profile definition by quantification using a computer-assisted method (31). The PrPd deposition type and distribution were examined on immunostained brain slices using the SAF84 mAb (SPI-Bio), as previously described (9, 32, 33). Gliosis was analyzed on slices immunostained using a polyclonal antibody to glial fibrillary acidic protein

© 2011 American Association of Neuropathologists, Inc.

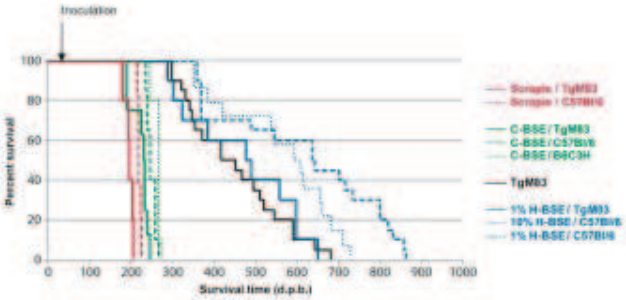


FIGURE 1. Kaplan-Meier survival curves for TgM83 mice and nontransgenic wild-type controls inoculated with scrapie C506M3, classic-type bovine spongiform encephalopathy (C-BSE), or H-type bovine spongiform encephalopathy (H-BSE) prion strains. TgM83 were inoculated i.c. at 6 weeks of age with 1% scrapie C506M3, 1% C-BSE, or 1% H-BSE. C57BL/6 mice were inoculated i.c. with 1% scrapie C506M3, 1% C-BSE, 1% H-BSE, or 10% H-BSE. B6C3H mice were inoculated with 1% C-BSE. Noninoculated TgM83 mice are also included. To allow comparisons of the groups inoculated with prion strains with the noninoculated TgM83 mice, the abscissa of this graph is expressed in days post birth (d.p.b.) representing the total survival times (from birth to death).

(Dako, Trappes, France), as described (9, 32, 33). Cells accumulating α-synuclein phosphorylated on serine 129 were detected using the Pser129 antibody. To enhance immunoreactivity for phosphorylated α-synuclein, sections were boiled in 0.1 mol/L of citrate buffer (pH 6.2) for 5 minutes using a microwave oven. Once refrigerated, the brain sections were immersed for 20 minutes in a 3-mol/L guanidine isothiocyanate solution to denature the proteins. After 3 washes in distilled water, endogenous peroxidase activity was blocked by a 5-minute immersion in 3% H_2O_2 solution. Primary antibody (Pser129) was applied at room temperature overnight (1:300) in a 0.1-mol/L saline phosphate buffer with 0.1× Triton. The secondary antibody (anti-rabbit; 1:200) was applied for 2 hours at room temperature. Antibody binding was detected using the avidin-biotin complex system (Vector Laboratories, Peterborough, UK) revealed by black deposition of 3, 3′ diaminobenzidine intensified with nickel chloride. The stained sections were observed under a light microscope BX51 (Olympus, Rungis, France) coupled to an image analysis workstation (MorphoExpert software; Explora Nova, La Rochelle, France).

Statistical Analysis

Comparisons of the survival distributions for scrapie, C-BSE, and H-BSE between transgenic mice overexpressing A53T human α-synuclein (TgM83) and nontransgenic C57BL/6 controls were assessed by applying log-rank tests, and survival curves were obtained by Kaplan-Meier method. Statistical analyses were made with R (*R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0; URL: http://www.R-project.org).

RESULTS

Reduced Scrapie C506M3, C-BSE, and H-BSE Incubation Periods in TgM83 Mice

The 3 prion strains were inoculated into TgM83 at 6 weeks of age, well before the onset of the motor phenotype associated with mutated α-synuclein overexpression. The incubation periods, that is, the time from the day of inoculation until death (dpi), in TgM83 mice were compared with those of identically inoculated nontransgenic C57BL/6 wt controls (Fig. 1).

For the scrapie C506M3 strain, the incubation period distributions were significantly different ($p < 0.0001$) with a median incubation period of 154 dpi in TgM83 mice versus 177 dpi in C57BL/6 controls (Table). For the C-BSE strain, a significant difference ($p < 0.0001$) was also observed with a median incubation period of 190 dpi in TgM83 mice versus

TABLE. Prion Transmissions (Scrapie C506M3, C-BSE, and H-BSE) to TgM83, C57BL/6, and B6C3H Mice

Prion Strains (% Brain Homogenate Inoculum)		Mouse Strain Host	Mean Incubation Periods (dpi)	No. PrPd-Positive Mice/Total	Positions of the PrPd-Positive Mice in the Cohort and Their Incubation Period (dpi)
Scrapie C506M3	1%	TgM83	154	5/5	1: 139 … 5: 164
	1%	C57BL/6	177	19/19	1: 173 … 19: 184
C-BSE	1%	TgM83	190	8/8	1: 148 … 8: 205
	1%	C57BL/6	204	20/20	1: 194 … 20: 224
	1%	B6C3H	225	10/10	1: 205 … 10: 231
H-BSE	1%	TgM83	444	4/10	7: 515
					8: 555
					9: 555
					10: 609
	1%	C57BL/6	601	3/20	16: 758
					18: 791
					19: 814
	10%	C57BL/6	555	4/14	6: 503
					9: 574
					10: 615
					13: 667

B6C3H indicates genetic background of transgenic line TgM83; C57BL/6, wild-type nontransgenic controls; dpi, days post-inoculation.

© 2011 American Association of Neuropathologists, Inc.

204 dpi in C57BL/6 mice (Table). C57BL/6 controls developed C-BSE significantly more rapidly than did nontransgenic B6C3H mice ($p < 0.0001$), that is, mice of the same genetic background as TgM83 mice (Table).

The incubation period for TgM83 mice inoculated i.c. with 1% H-BSE was compared with that of C57BL/6 mice infected with the same stock of prion, at either 1% or at 10% (Fig. 1). TgM83 mice inoculated with 1% H-BSE died significantly more rapidly than the identically inoculated C57BL/6 controls ($p = 0.0064$): the median incubation period of 1% H-BSE decreased drastically from 601 dpi in C57BL/6 mice to 441 dpi in TgM83 mice (Table). The distribution of the incubation periods of 1% H-BSE in TgM83 mice was even significantly different from that for C57BL/6 controls inoculated with 10% H-BSE ($p = 0.0351$): the median incubation period of 1% H-BSE in TgM83 was 111 dpi shorter than that of C57BL/6 mice inoculated with 10% H-BSE (Table).

A group of noninoculated TgM83 mice that were killed after the emergence of clinical signs because of the α-synuclein pathology was also included (Fig. 1). There was no difference in survival times between this control group and that of TgM83 mice inoculated with 1% H-BSE ($p = 0.536$). It should be noted that this comparison was of the total survival periods (i.e. period between the birth and death of mice expressed in days after birth), not of the incubation times, because it involved TgM83 mice that were not inoculated (Fig. 1).

All 5 TgM83 mice inoculated with the scrapie strain and 5 of the 8 TgM83 mice inoculated with the C-BSE strain were killed after the onset of clinical signs, whereas the others were found dead. These signs (hunched posture, weight loss, reduced mobility, tail chewing, clasping, and difficulty or inability to stand up) seemed related to prion diseases because, as in the noninoculated aged TgM83 mice, no partial paralysis or stiffness of hind limb and tail was observed. Only 4 of the 10 TgM83 mice inoculated with H-BSE were killed after the development of clinical signs (hunched posture, weight loss, tremor, prostration, and, for 1 mouse, an inability to stand up). In view of this limited number of mice and this mixed symptoms, it was difficult to determine the involvement of prion disease versus α-synuclein pathology in the development of these clinical signs.

Typical Histopathologic and Biochemical Features of Scrapie C506M3, C-BSE, and H-BSE Prion Strains in Inoculated TgM83 Mice

On the basis of immunohistochemical and biochemical analyses, all TgM83 mice inoculated with scrapie C506M3 or C-BSE were positive for PrPd. In contrast, among the 10 TgM83 mice inoculated with 1% H-BSE, only 4 mice (dead at positions 7, 8, 9, and 10; i.e. dpi 515, 555, 555, and 609, respectively) exhibited accumulation of PrPd (Table). In comparison, 3 of the 20 C57BL/6 controls inoculated with 1% H-BSE (dead at positions 16, 18, and 19, i.e. dpi 758, 791, and 814, respectively) were PrPd-positive (Table). Thus, inoculation of TgM83 mice with 1% H-BSE led to an initial accumulation of PrPd that was identified 243 days earlier than in the C57BL/6 control mice inoculated under the same conditions.

Mice inoculated with each of the 3 prion strains showed typical vacuolar lesions. After C-BSE transmission in TgM83 mice, vacuolar lesions were mainly observed in brain areas 1-4-7 (dorsal medulla nuclei, hypothalamus, septal nuclei). Remarkably, the typical vacuolation of the cochlear nucleus usually found in C57BL/6 mice infected with C-BSE was also seen (Fig. 2A). The scrapie C506M3 strain induced milder vacuolar lesions that were more widely distributed in the brains of TgM83 mice (Fig. 2A). In addition to this extensive spongiosis, brains infected with scrapie C506M3 or C-BSE both exhibited typical reactive astrogliosis and PrPd accumulations as fine granular deposits and small plaques (Fig. 2A). In contrast, histologic analyses of PrPd-positive TgM83 mice inoculated with H-BSE revealed no or very minimal vacuolar lesions. Remarkably, PrPd deposits were detected only in the shape of amyloid plaques as shown by Congo red staining observed under polarized light (Fig. 2A). Reactive gliosis was also detected in these infected TgM83 mice (Fig. 2A).

After proteinase K treatment and Western blot analyses of TgM83 brains inoculated with C-BSE, 3 bands corresponding to the nonglycosylated (19.0 kDa), monoglycosylated (22.8 kDa), and biglycosylated (26.0 kDa) forms of the PrP^{res} were detected with antibody Sha31 (Fig. 2B). Similarly, TgM83 mice inoculated with scrapie C506M3 presented the expected profile in which the apparent molecular mass (19.7 kDa) of the nonglycosylated band was higher than in C-BSE (19.0 kDa) (Fig. 2B). The biglycosylated-to-monoglycosylated glycoform ratios of scrapie C506M3 and C-BSE in TgM83 mice (means of 51/37 and 65/27, respectively) remained similar to those obtained in their respective C57BL/6 controls (means of 50/37 and 61/28) (Fig. 2B). As in C57BL/6 mice, these glycoform ratios were lower in scrapie than in C-BSE samples in TgM83 mice. Further Western blot analyses with mAb 12B2 also showed that the molecular features of scrapie C506M3 and C-BSE were conserved after a first passage through TgM83 mice: the usual 3-band profile was obtained for the scrapie strain C506M3, whereas no immunoreactivity was observed in TgM83 mice infected with C-BSE (Fig. 2C).

Biochemical studies of PrP^{res}-positive TgM83 mice inoculated with 1% H-BSE showed molecular features consistent with those previously described for H-BSE, that is, the apparent molecular mass of the 3 PrP^{res} glycoforms was 1.5 kDa higher than that found in mice infected with a C-BSE isolate (Fig. 2D). In addition, a more C-terminally cleaved fragment of PrP^{res} (PrP^{res} #2), with an unglycosylated form migrating at 14 kDa, was also detected by SAF84, an antibody directed against the C-terminal part of the prion protein (Fig. 2D). Finally, the same molecular pattern, characteristic of the H-BSE prion strain, was found in brains of PrP^{res}-positive C57BL/6 mice inoculated either with 1% or with 10% H-BSE (Fig. 2D).

TgM83 Mice Infected With Scrapie C506M3 or C-BSE Do Not Exhibit α-Synuclein Pathology Whereas Concomitant Alterations of Prion Protein and α-Synuclein Are Observed in TgM83 Mice Inoculated With H-BSE

Western blot analysis of symptomatic TgM83 mice killed at 14 months of age showed considerable amounts of

© 2011 American Association of Neuropathologists, Inc.

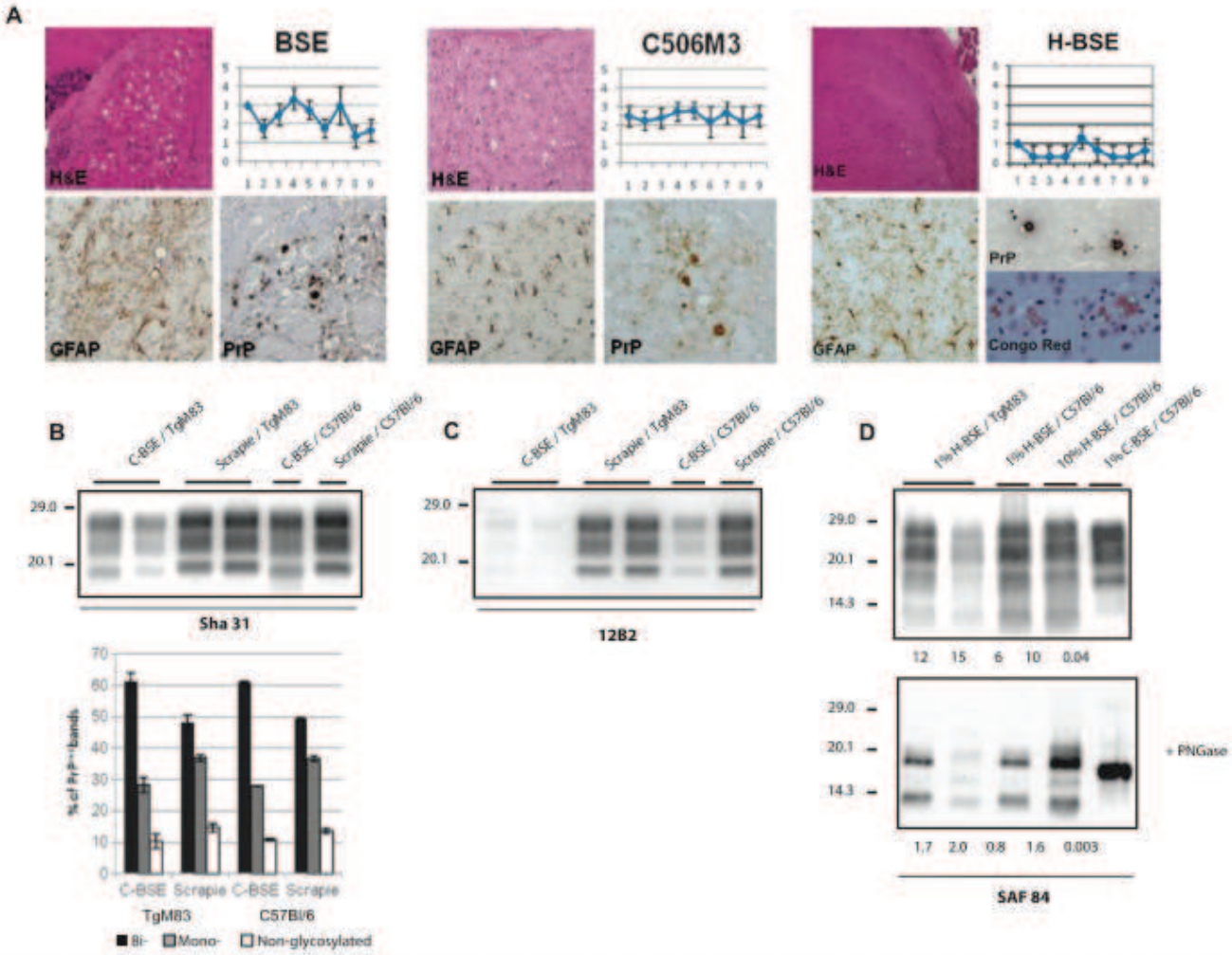


FIGURE 2. Classic-type bovine spongiform encephalopathy (C-BSE), scrapie C506M3, and H-type bovine encephalopathy (H-BSE) prion strains maintain their usual histopathologic and biochemical characteristics after a passage in TgM83 mice. **(A)** Neuropathology of TgM83 mice inoculated at first passage either with C-BSE (left panel), scrapie C506M3 (middle panel), or H-BSE (right panel) strains from C57BL/6 mice. Hematoxylin and eosin (H&E)–stained brain sections reveal typical vacuolar lesions shown in the cochlear nucleus for C-BSE and H-BSE and in the septum for C506M3 strain. The respective lesion profiles were established from the H&E-stained sections. 1, dorsal medulla nuclei; 2, cerebellar cortex; 3, superior colliculus; 4, hypothalamus; 5, central thalamus; 6, hippocampus; 7, septal nuclei; 8, cerebral cortex at the thalamus; 9, cerebral cortex at the septal nuclei. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunostaining indicated the occurrence of gliosis, shown in the striatum (stellate brown-colored labeling) in each experiment. Immunohistochemical analyses of PrPd with monoclonal antibody SAF84 showed fine granular deposits and small plaques for C-BSE and scrapie C506M3 (illustrated in the striatum), whereas only typical amyloid plaques were found in the thalamus for H-BSE (consistent with the birefringence after Congo red staining observed under polarized light). **(B, C)** Brain PrP^{res} from TgM83 mice and C57BL/6 controls inoculated with C-BSE or with scrapie C506M3 strains detected by Western blot with Sha31 **(B)** or 12B2 **(C)** antibodies. Brain tissue aliquots (20 μg) were loaded by lane except for the second TgM83 mouse inoculated with C-BSE for which 40 μg was loaded. Mean percentages (±SD) of the 3 PrP^{res} bands are shown on the graph (biglycosylated band in black bars, mono-glycosylated band in gray bars, and nonglycosylated band in white bar). **(D)** Brain PrP^{res} from TgM83 and C57BL/6 mice, inoculated either with 1% or with 10% H-BSE brain homogenates detected by SAF84. The quantities of brain homogenates in milligrams loaded per well are indicated under each lane.

phosphorylated α-synuclein in the detergent-insoluble fraction (Fig. 3). The molecular pattern associated with these altered forms of α-synuclein was composed of (i) a main band at 18 kDa corresponding to monomeric α-synuclein, (ii) a second band at 24 kDa that might represent mono-ubiquitinated α-synuclein, and (iii) high-molecular weight forms of α-synuclein (Fig. 3). Conversely, no phosphorylated insoluble form of α-synuclein was detected in brains of non-inoculated TgM83

© 2011 American Association of Neuropathologists, Inc.

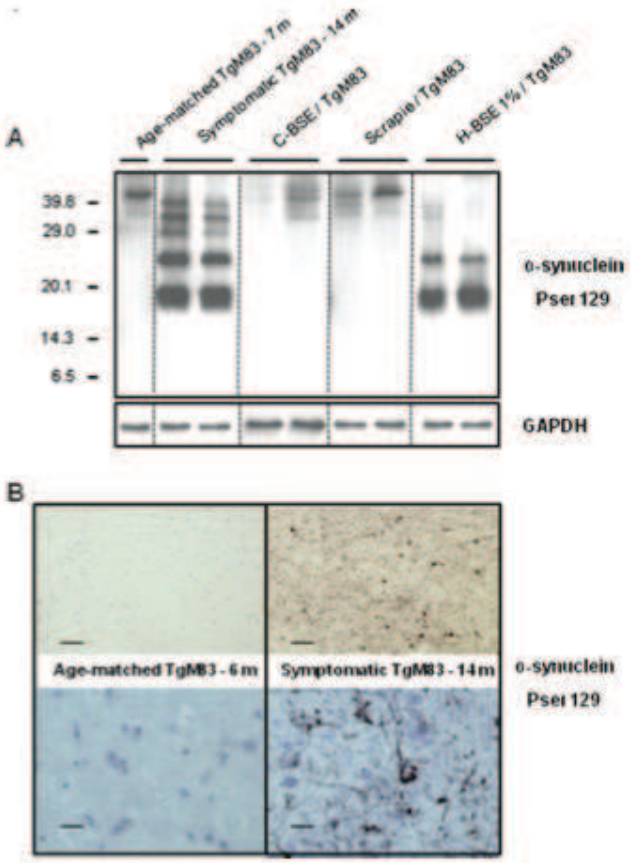


FIGURE 3. TgM83 mice inoculated with H-type bovine spongiform encephalopathy (H-BSE) prion strain develop α-synuclein alterations, whereas no pathological forms of α-synuclein are detected in mice that died of scrapie C506M3 or classical bovine spongiform encephalopathy (C-BSE). **(A)** Insoluble and phosphorylated forms of α-synuclein from TgM83 mice inoculated with C-BSE, scrapie C506M3, or H-BSE were detected by Western-blot with an anti-Pser129 α-synuclein antibody. Symptomatic 14-month-old and asymptomatic 7-month-old TgM83 mice are included as non-inoculated controls. Immunodetection of a ubiquitous protein (GAPDH) confirmed that comparative amounts of proteins were loaded in the lanes. **(B)** Upper panel: low-power light microscopy of phosphorylated α-synuclein detected by immunohistochemistry with anti-Pser129 α-synuclein antibody. Bar = 60 μm. There is no staining in the brain of a control asymptomatic 6-month-old TgM83 mouse. Accumulation of phosphorylated α-synuclein is detected in non-inoculated but symptomatic 14-month-old TgM83 mouse. Higher magnification (lower panel) illustrates typical perikaryal cytoplasmic and neuronal process staining. Bar = 16 μm.

mice killed at 7 months of age or in mice that died because C506M3 or C-BSE prion infection, before development of the clinical signs associated with synucleinopathy (Fig. 3).

TgM83 mice inoculated with prion strains of scrapie C506M3 (dead at ~6.5 months of age) or C-BSE (dead at ~7.5 months of age) did not demonstrate any insoluble form of phosphorylated α-synuclein by Western blot (Fig. 3A). This result suggested that the drastic molecular alterations of human α-synuclein specific to an advanced stage of synucleinopathy had not yet occurred in mice inoculated with scrapie C506M3 or C-BSE at the time of death.

By contrast, the same molecular alterations of α-synuclein were observed in all TgM83 mice inoculated with H-BSE, whether they were PrPd-positive or not. Western blot analyses showed an accumulation of insoluble phosphorylated α-synuclein as in symptomatic TgM83 mice that died at the same time (i.e. at 14 months of age) (Fig. 3A). Similarly, accumulation of phosphorylated α-synuclein was not seen in young control TgM83 mice but was clearly detected in control noninoculated symptomatic TgM83 mice (Fig. 3B) and in H-BSE inoculated TgM83 mice as well (data not shown).

DISCUSSION

Neurodegenerative diseases are often associated with the misfolding and deposition of neuronal proteins, such as β-amyloid peptide and τ protein in Alzheimer disease, prion protein in TSEs, and α-synuclein in PD and related disorders. Because the simultaneous presence of several of these damaged proteins has been commonly observed in association with the same pathological findings (22, 23, 34–39), recent studies have investigated their possible molecular interactions. Indeed, hybrid complexes involving A-β peptide with τ protein (40), α-synuclein (41, 42), or prion protein (43) have been demonstrated. In addition, τ- and α-synuclein can self-associate and promote their own polymerization into fibrils (21, 44–46).

Few data have been published regarding the occurrence of potential interactions between prion protein and α-synuclein in neurodegenerative diseases. Moreover, 2 previous immunohistochemical analyses of various cases of prion diseases (human patients with CJD, sheep and goats with natural scrapie, or hamsters experimentally inoculated with prions) revealed the existence of immunoreactive α-synuclein deposits in the brains but with no obvious colocalization of PrPd and α-synuclein (24, 26). Conversely, detailed neuropathological studies of genetic cases of CJD have recently highlighted intense neurodegeneration associated with deposits of proteins, including α-synuclein, but typical Lewy bodies and Lewy neurites were only identified in 6 (15.4%) of the 39 cases studied with an E200K mutation; 13 other cases showed prominent neuronal granular diffuse cytoplasmic immunoreactivity in some brain areas (22). Recent experiments have demonstrated that the accumulation of PrPd, synaptic loss, and behavioral dysfunction associated with the murine scrapie strain ME7 are not modified by spontaneous deletion of the α-synuclein gene *snca* harbored by a substrain of C57BL/6 mice (47). These findings led the authors to conclude that α-synuclein deficiency does not contribute to the compartment-specific processes that give rise to prion disease–mediated synaptotoxicity and neurodegeneration (47). Consequently, the question as to whether prion protein and α-synuclein alterations affect each other remains of interest and requires further experimental investigations.

To trigger a prion disease concomitantly with a synucleinopathy, transgenic mice overexpressing human A53T α-synuclein were challenged i.c. with 3 different prion strains. Such transgenic mice spontaneously displayed age-dependent

© 2011 American Association of Neuropathologists, Inc.

motor impairment when the animals are 10 to 22 months old. The onset of clinical disease was associated with the development of amyloidogenic, filamentous intraneuronal inclusions of α-synuclein that mirror many of the histopathologic and biochemical features of human synucleinopathies (27, 48, 49). Here, our Western blot analysis confirmed that the pathological forms of α-synuclein in the mouse brains had the same molecular characteristic as that observed in the human disease, that is, the altered α-synuclein extracted from symptomatic TgM83 mice was detergent-insoluble and phosphorylated on serine residue 129 (50–52). A reliable correlation between disease development and the detection of insoluble Pser129 α-synuclein, including species with retarded electrophoretic mobility, was reported in mice that overexpress human A30P α-synuclein, another mouse model of synucleinopathy (53). The TgM83 murine model was chosen for this study because the clinical and molecular changes occurring during the aging of these mice provide reliable criteria distinct from those known in prion diseases for the specific detection of α-synuclein–associated alterations. However, it would also be relevant to carry out inoculations with prions in transgenic mice expressing human wt α-synuclein (instead of a mutated form) to develop a model that reproduces the potential pathological relationship that might occur between prion and α-synuclein in sporadic CJD.

We found that scrapie C506M3 and C-BSE incubation periods were greatly decreased in TgM83 mice in comparison to those of identically non-transgenic C57BL/6 controls. In contrast, all the TgM83 mice inoculated with scrapie C506M3 or C-BSE died of prion disease before the onset of detectable insoluble α-synuclein phosphorylated on serine 129. To trigger a prion disease synchronously with an α-synuclein pathology, scrapie C506M3 and C-BSE prion strains could also be inoculated intraperitoneally into TgM83 mice, which would lead to delayed onset of these prion diseases (54).

TgM83 mice were also inoculated with 1% H-BSE, an atypical bovine strain that possesses a longer incubation period than scrapie C506M3 and C-BSE in C57BL/6 mice (55). The median incubation period of TgM83 mice inoculated with 1% H-BSE was significantly shorter than that of C57BL/6 controls infected with the same agent either at 1% or at 10%. Transmission of H-BSE did not change the total life span of TgM83 mice, that is, statistical analyses failed to show any significant difference between the median incubation period of TgM83 mice inoculated with 1% H-BSE and that of noninoculated TgM83 mice. All TgM83 mice inoculated with H-BSE had α-synuclein molecular alterations typical of an advanced stage of synucleinopathy (i.e. insoluble and phosphorylated on serine 129 residue). Moreover, PrPd accumulations were observed in the last 4 mice of the cohort that died of 515 dpi onward (earlier than C57BL/6 controls inoculated with 1% H-BSE). Thus, these 4 TgM83 mice exhibited a prion disease alongside extensive α-synuclein pathology. It should be noted that a similarly low attack rate was found after inoculation of C57BL/6 mice with the same brain homogenate and that this differed strikingly from the high attack rate previously reported after inoculations of C57BL/6 mice with an inoculum produced from another mouse inoculated with the same H-BSE isolate (03-2095) (55). As previously done for scrapie and C-BSE strains in C57BL/6 (54, 56), further measurements of the PrPd amounts in brains of inoculated TgM83 mice over time would be informative in this context.

It seems unlikely that the reduction of the incubation periods of scrapie C506M3, C-BSE, and H-BSE in TgM83 mice was linked to changes in the properties of prion strains. No modification in the histopathologic and molecular features of these 3 prion strains was observed in TgM83 mice compared with the C57BL/6 mice. All TgM83 mice inoculated with scrapie C506M3 and C-BSE had the same molecular characteristics (immunoreactivity, glycoform ratios) and lesion profiles as those described in infected C57BL/6 mice (12, 28, 57). The pathological forms of prion, apparent from 515 dpi in TgM83 mice inoculated with H-BSE, showed similar molecular features and brain lesions to those observed in C57BL/6 mice after a first passage of the same inoculum (29, 58). These molecular features were also identical to those described in cattle (59, 60) or in bovine transgenic mice (61) with H-type BSE. Conversely to what was recently reported in a few mice during some second passages of the same H-BSE isolate, no emergence of C-BSE properties was observed here (55). Nonetheless, possible changes of the infectious agents in TgM83 mice cannot be fully excluded based solely on phenotypic characterization of the resulting disease. To verify this, we would have to transmit the disease from TgM83 mice to C57BL/6 mice, the previous hosts of these TSEs. Indeed, previous studies have suggested that the virulence of prion agents can be modified even if the biochemical signature, lesion profile, and PrPd deposition pattern of a prion strain are similar, at least after crossing a species barrier (62).

The reduced incubation periods observed in prion inoculated TgM83 mice might also not be due to their genetic background: statistical analyses showed that B6C3H mice (i.e. the TgM83 genetic background) developed C-BSE significantly slower than C57BL/6 controls. However, the remote possibility that the insertion of the α-synuclein transgene into the genome of TgM83 mice had modified their genetic susceptibility to prion disorders could not be totally excluded (63).

The early onset of neurologic disease in TgM83 mice inoculated with scrapie C506M3 or C-BSE prion strains occurred independently of the presence of detectable altered forms of α-synuclein specific to an advanced stage of synucleinopathy. It is possible that our Western blot analyses was not sufficiently sensitive to detect very low levels of insoluble and phosphorylated forms of α-synuclein; such forms might be sufficient to increase the neuronal susceptibility to prion infection. Whereas this last form of the protein is only detectable at the late stage of the disease, other yet uncharacterized pathological forms of the protein could also be present at earlier stages. We cannot exclude the possibility that molecular interactions exist between PrPd and such other forms of pathological α-synuclein. Speculatively, it is conceivable that α-synuclein, which can be both soluble in the cytoplasm (64) or bound to membranes via the formation of N-terminal α helices (65), would influence conversion of PrPc into PrPd, an event that occurs in membrane-bound vesicles (66).

© 2011 American Association of Neuropathologists, Inc.

Direct interaction between the α-synuclein and prion proteins is, however, not necessarily required to explain our results and we propose several possible mechanisms that could explain earlier disease in TgM83 mice inoculated with scrapie or classic BSE. Overburden of the proteasome system and/or of the lysosomal pathway in a mouse brain faced with an overproduction of misfolded proteins might lead to an aggravation of the pathology (67–70). Impairment of the ubiquitin-proteasome system in neurons has been described in a mouse model overexpressing the A53T α-synuclein (71), and a relationship between α-synuclein oligomers and inhibition of proteasome activities was shown in vitro (72). Such impairment could directly explain shortened survival after prion infection of mice overexpressing the A53T α-synuclein. Other possibilities would be that PrPd and pathological α-synuclein could act concomitantly to induce oxidative stress, membrane disruption, and mitochondrial impairments that might initiate the synaptic pathology common to these 2 diseases (73–77). Using recombinant adenoassociated virus 2–mediated delivery of A53T human α-synuclein, it was shown that levels of proteins involved in synaptic transmission and axonal transport were altered at early stages of disease progression, well before neuronal cell death occurs (78). Interestingly, a recent study using lentivirus-based expression of α-synuclein variants showed the high in vivo toxicity of membrane-associated oligomers from variants prone to oligomerization, whereas variants that formed fibrils were less toxic; the mechanism of toxicity was linked to alterations in the permeability and integrity of the cell membrane (79). Similar mechanisms might facilitate the development of prion diseases in mice with mutated α-synuclein before the advanced stage of synucleinopathy.

In conclusion, we demonstrate that some transgenic mice overexpressing human A53T α-synuclein and inoculated with H-BSE PrPd i.c. developed a prion disease alongside the synucleinopathy. More generally, our study is the first description of a model aimed at defining the potential linkage between PrPd and α-synuclein.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dominique Canal for the Western blot experiments; Céline Raynaud and Mikaël Leboidre for excellent histotechnical assistance; and Emilie Antier, Coralie Pulido, and Damien Gaillard for performing animal experiments.

REFERENCES

1. Glabe CG. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. Neurobiol Aging 2006;27:570–75
2. Soto C, Estrada LD. Protein misfolding and neurodegeneration. Arch Neurol 2008;65:184–89
3. Saha AR, Ninkina NN, Hanger DP, et al. Induction of neuronal death by α-synuclein. Eur J Neurosci 2000;12:3073–77
4. Cookson MR. α-Synuclein and neuronal cell death. Mol Neurodegener 2009;4:9
5. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. Trends Cell Biol 2000;10:524–30
6. Morimoto RI. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. Genes Dev 2008;22:1427–38
7. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 1982;216:136–44
8. Baron T, Bencsik A, Vulin J, et al. A C-terminal protease-resistant prion fragment distinguishes ovine "CH1641-like" scrapie from bovine classical and L-Type BSE in ovine transgenic mice. PLoS Pathog 2008;4: e1000137
9. Bencsik A, Baron T. Bovine spongiform encephalopathy agent in a prion protein (PrP)ARR/ARR genotype sheep after peripheral challenge: Complete immunohistochemical analysis of disease-associated PrP and transmission studies to ovine-transgenic mice. J Infect Dis 2007;195: 989–96
10. Bruce ME. Strain Typing Studies in Scrapie and BSE. In: Baker H, Ridley RM, eds. *Methods in Molecular Medicine. Prion Diseases, vol. 3.* Totowa, NJ: Humana Press, 1996:223–36
11. Brown DA, Bruce ME, Fraser JR. Comparison of the neuropathological characteristics of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in mice. Neuropathol Appl Neurobiol 2003;29:262–72
12. Baron T, Crozet C, Biacabe AG, et al. Molecular analysis of the protease-resistant prion protein in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. J Virol 2004;78:6243–51
13. El-Agnaf OM, Jakes R, Curran MD, et al. Effects of the mutations Ala30 to Pro and Ala53 to Thr on the physical and morphological properties of α-synuclein protein implicated in Parkinson's disease. FEBS Lett 1998; 440:67–70
14. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the α-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science 1997;276:2045–47
15. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. α-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science 2003;302:841
16. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, et al. α-Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. Lancet 2004;364: 1167–69
17. Greenbaum EA, Graves CL, Mishizen-Eberz AJ, et al. The E46K mutation in α-synuclein increases amyloid fibril formation. J Biol Chem 2005; 280:7800–7
18. Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, et al. Causal relation between α-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. Lancet 2004;364:1169–71
19. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al. α-Synuclein in Lewy bodies. Nature 1997;388:839–40
20. Shults CW. Lewy bodies. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:1661–68
21. Giasson BI, Lee VM, Trojanowski JQ. Interactions of amyloidogenic proteins. Neuromol Med 2003;4:49–58
22. Kovacs GG, Seguin J, Quadrio I, et al. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease associated with the E200K mutation: Characterization of a complex proteinopathy. Acta Neuropathol 2010;121:39–57
23. Kovacs GG, Botond G, Budka H. Protein coding of neurodegenerative dementias: The neuropathological basis of biomarker diagnostics. Acta Neuropathol 2010;119:389–408
24. Haik S, Privat N, Adjou KT, et al. α-Synuclein–immunoreactive deposits in human and animal prion diseases. Acta Neuropathol 2002;103: 516–20
25. Vital A, Fernagut PO, Canron MH, et al. The nigrostriatal pathway in Creutzfeldt-Jakob disease. J Neuropathol Exp Neurol 2009;68:809–15
26. Adjou KT, Allix S, Ouidja MO, et al. α-Synuclein accumulates in the brain of scrapie-affected sheep and goats. J Comp Pathol 2007;137:78–81
27. Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, et al. Neuronal α-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α-synuclein. Neuron 2002;34:521–33
28. Lezmi S, Bencsik A, Baron T. PET-blot analysis contributes to BSE strain recognition in C57BL/6 mice. J Histochem Cytochem 2006;54: 1087–94
29. Biacabe AG, Jacobs JG, Bencsik A, et al. H-type bovine spongiform encephalopathy: Complex molecular features and similarities with human prion diseases. Prion 2007;1:61–68
30. Fraser H, Dickinson AG. The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. J Comp Pathol 1968;78:301–11
31. Bencsik A, Philippe S, Vial L, et al. Automatic quantitation of vacuolar lesions in the brain of mice infected with transmissible spongiform encephalopathies. J Virol Methods 2005;124:197–202
32. Lezmi S, Bencsik A, Monks E, et al. First case of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah born in France: PrP(sc) analysis in

© 2011 American Association of Neuropathologists, Inc.

various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland. Histochem Cell Biol 2003;119:415–22
33. Benesik AA, Coleman AW, Debeer SO, et al. Amplified immunohistochemical detection of PrPsc in animal transmissible spongiform encephalopathies using streptomycin. J Histochem Cytochem 2006;54:849–53
34. Selikhova M, Williams DR, Kempster PA, et al. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. Brain 2009;132:2947–57
35. Small SA, Duff K. Linking Aβ and τ in late-onset Alzheimer's disease: A dual pathway hypothesis. Neuron 2008;60:534–42
36. Muramoto T, Kitamoto T, Koga H, et al. The coexistence of Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease in a patient with dementia of long duration. Acta Neuropathol 1992;84:686–89
37. Ghoshal N, Cali I, Perrin RJ, et al. Codistribution of amyloid beta plaques and spongiform degeneration in familial Creutzfeldt-Jakob disease with the E200K-129 M haplotype. Arch Neurol 2009;66:1240–46
38. Duda JE, Giasson BI, Mabon ME, et al. Concurrence of α-synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred. Acta Neuropathol 2002;104:7–11
39. Clinton LK, Blurton-Jones M, Myczek K, et al. Synergistic Interactions between Aβ, tau, and α-synuclein: Acceleration of neuropathology and cognitive decline. J Neurosci 2010;30:7281–89
40. Guo JP, Arai T, Miklossy J, et al. Aβ and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:1953–58
41. Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, et al. Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. PLoS One 2008;3:e3135
42. Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, et al. β-Amyloid peptides enhance α-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:12245–50
43. Morales R, Estrada LD, Diaz-Espinoza R, et al. Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases. J Neurosci 2010;30:4528–35
44. Marui W, Iseki E, Ueda K, et al. Occurrence of human α-synuclein immunoreactive neurons with neurofibrillary tangle formation in the limbic areas of patients with Alzheimer's disease. J Neurol Sci 2000;174:81–84
45. Schmidt ML, Martin JA, Lee VM, et al. Convergence of Lewy bodies and neurofibrillary tangles in amygdala neurons of Alzheimer's disease and Lewy body disorders. Acta Neuropathol 1996;91:475–81
46. Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, et al. Seeded aggregation and toxicity of α-synuclein and tau: Cellular models of neurodegenerative diseases. J Biol Chem 2010;5:34885–98
47. Asuni AA, Hilton K, Siskova Z, et al. α-Synuclein deficiency in the C57BL/6JOlaHsd strain does not modify disease progression in the ME7-model of prion disease. Neuroscience 2009;165:662–74
48. Lee MK, Stirling W, Xu Y, et al. Human α-synuclein–harboring familial Parkinson's disease–linked Ala-53 –> Thr mutation causes neurodegenerative disease with α-synuclein aggregation in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:8968–73
49. Waxman EA, Giasson BI. Molecular mechanisms of α-synuclein neurodegeneration. Biochim Biophys Acta 2009;1792:616–24
50. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al. α-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. Nat Cell Biol 2002;4:160–64
51. Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. J Biol Chem 2006;281:29739–52
52. Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, et al. Phosphorylated α-synuclein is ubiquitinated in α-synucleinopathy lesions. J Biol Chem 2002;277:49071–76
53. Fournier M, Vitte J, Garrigue J, et al. Parkin deficiency delays motor decline and disease manifestation in a mouse model of synucleinopathy. PLoS One 2009;4:e6629
54. Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, et al. Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. J Gen Virol 1996;77:1601–9
55. Baron T, Vulin J, Biacabe AG, et al. Emergence of classical BSE strain properties during serial passage of H-BSE in wild-type mice. PLoS One 2011;6:e15839
56. Maignien T, Lasmezas CI, Beringue V, et al. Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. J Gen Virol 1999;80:3035–42
57. Ritchie DL, Boyle A, McConnell I, et al. Transmissions of variant Creutzfeldt-Jakob disease from brain and lymphoreticular tissue show uniform and conserved bovine spongiform encephalopathy-related phenotypic properties on primary and secondary passage in wild-type mice. J Gen Virol 2009;90:3075–82
58. Baron TG, Biacabe AG, Benecsik A, et al. Transmission of new bovine prion to mice. Emerg Infect Dis 2006;12:1125–28
59. Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, et al. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. EMBO Rep 2004;5:110–15
60. Jacobs JG, Langeveld JP, Biacabe AG, et al. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. J Clin Microbiol 2007;45:1821–29
61. Nicot S, Baron T. Strain-specific barriers against bovine prions in hamsters. J Virol 2011;85:1906–8
62. Espinosa JC, Andreoletti O, Castilla J, et al. Sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent exhibits altered pathobiological properties in bovine-PrP transgenic mice. J Virol 2007;81:835–43
63. Lloyd SE, Collinge J. Genetic susceptibility to prion diseases in humans and mice. Curr Genomics 2005;6:1–11
64. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, et al. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. Biochemistry 1996;35:13709–15
65. Kim YS, Laurine E, Woods W, et al. A novel mechanism of interaction between α-synuclein and biological membranes. J Mol Biol 2006;360:386–97
66. Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, et al. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-^{res} (PrP(Sc)) into contiguous membranes. EMBO J 2002;21:1031–40
67. Bennett MC, Bishop JF, Leng Y, et al. Degradation of α-synuclein by proteasome. J Biol Chem 1999;274:33855–58
68. Giasson BI, Lee VM. Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? Cell 2003;114:1–8
69. Zhang NY, Tang Z, Liu CW. α-Synuclein protofibrils inhibit 26S proteasome–mediated protein degradation: Understanding the cytotoxicity of protein protofibrils in neurodegenerative disease pathogenesis. J Biol Chem 2008;283:20288–98
70. Eriksen JL, Dawson TM, Dickson DW, et al. Caught in the act: α-synuclein is the culprit in Parkinson's disease. Neuron 2003;40:453–56
71. Lin X, Parisiadou L, Gu XL, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant α-synuclein. Neuron 2009;64:807–27
72. Emmanouilidou E, Stefanis L, Vekrellis K. Cell-produced α-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. Neurobiol Aging 2010;31:953–68
73. Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, et al. α-Synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. Am J Pathol 2000;157:401–10
74. Siskova Z, Mahad DJ, Pudney C, et al. Morphological and functional abnormalities in mitochondria associated with synaptic degeneration in prion disease. Am J Pathol 2010;177:1411–21
75. Fuhrmann M, Mitteregger G, Kretzschmar H, et al. Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. J Neurosci 2007;27:6224–33
76. Sulzer D. Clues to how α-synuclein damages neurons in Parkinson's disease. Mov Disord 2010;25(Suppl 1):S27–31
77. Smith WW, Jiang H, Pei Z, et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant α-synuclein–induced toxicity. Hum Mol Genet 2005;14:3801–11
78. Chung CY, Koprich JB, Siddiqi H, et al. Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV α-synucleinopathy. J Neurosci 2009;29:3365–73
79. Winner B, Jappelli R, Maji SK, et al. In vivo demonstration that α-synuclein oligomers are toxic. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:4194–99

© 2011 American Association of Neuropathologists, Inc.

III. Transmission des altérations biochimiques de l'α-synucléine d'une souris à l'autre

Résumé des résultats en cours de soumission

Cette étude a pour but d'éprouver expérimentalement, *in vivo*, la capacité potentielle des altérations pathologiques de l'α-synucléine à se transmettre de proche en proche, comme le feraient les protéines prion pathologiques lors des ESST.

Pour cela, nous avons utilisé des souris transgéniques TgM83 qui développent, au cours de leur vieillisement, une symptomatologie motrice sévère liée à la surexpression d'α-synucléine humaine mutée en A53T. Afin de caractériser plus finement ce modèle, nous avons voulu déterminer quelles altérations biochimiques de l'α-synucléine apparaissent de façon corrélée aux signes cliniques moteurs. Nos résultats ont montré que la détection en Western-blot de formes à la fois insolubles dans les détergents et phosphorylées en sérine 129 de l'α-synucléine peut être utilisée comme un critère signant, d'un point de vue moléculaire, la présence d'une synucléinopathie.

Ainsi, afin d'étudier l'éventuel potentiel de transmission des altérations de l'α-synucléine, nous avons préparé des homogénats de cerveaux de souris transgéniques TgM83 symptomatiques, contenant des formes insolubles et phosphorylées de l'α-synucléine. L'inoculation par voie intra-cérébrale de ces homogénats à de jeunes souris TgM83 provoque le dévelopement très précoce de signes cliniques moteurs identiques à ceux usuellement observés 8 mois et demi plus tard en moyenne chez des souris TgM83 non-inoculées. La précocité de cette symptomatologie caractéristique d'une synucléinopathie est couplée à celle de l'apparition, dans le cerveau de ces souris, d'α-synucléine insoluble et phosphorylée en sérine 129.

En définitive, l'importante accélération de la synucléinopathie observée chez des souris TgM83 de façon consécutive à leur inoculation par des tissus contenant des altérations de l'α-synucléine, constitue un résultat expérimental soutenant le fait que la pathologie liée à l'α-synucléine serait capable de se transmettre selon des mécanismes qualifiés de « prion-like ».

Prion-like mouse-to-mouse transmission of α-synuclein biochemical alterations

Running Title: **Transmission of α-synuclein Alterations**

Anne-Laure J. Mougenot[1, 2], Simon Nicot[1], Eric Morignat[1], Jérémy Verchère[1], Latefa Lakhdar[1], Stéphane Legastelois[2], Thierry G. Baron[1+]

[1]*Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail – anses, 31 Avenue Tony Garnier, 69394 Lyon cedex 07, France*
[2]*Indicia Biotechnology, 33 Avenue de la Californie, 69600 Oullins, France*

[+]Corresponding author:
Tel: +33 4 78 72 65 43; Fax: +33 4 78 61 91 45; thierry.baron@anses.fr

Keywords: **α-synuclein, prion, neurodegeneration, Parkinson's disease, protein misfolding**

ABSTRACT

Our aim in this study was to investigate experimentally the possible transmission of pathological alterations of α-synuclein through mechanisms reminiscent of prion propagation. Intracerebral inoculations with brain homogenates from old transgenic mice overexpressing human mutated α-synuclein and containing insoluble and phosphorylated α-synuclein triggered an early onset of motor clinical signs and similar α-synuclein alterations in inoculated mice. Acceleration of the pathology following inoculation of mice by tissues from symptomatic mice affected by a synucleinopathy, supports the idea of a "prion-like" propagation of α-synuclein alterations.

INTRODUCTION

Pathological accumulation of misfolded neuronal proteins, leading to synaptic dysfunction and cell death, is assumed to play a central role in the pathogenesis of many neurodegenerative disorders. However, prion diseases are distinguishable from other such diseases by the fact that they can be transmitted between individuals and across species. The misfolded and aggregated form of the prion protein is now accepted to be the major, if not only, component that propagates these diseases by inducing conversion of the normal host prion protein into its pathological conformer (Prusiner 1982). This results in propagation of the molecular alterations of the prion protein,

including insolubility in non-ionic detergents and partial resistance to protease digestion. Although Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB) and multiple system atrophy (MSA) are not infectious pathologies, the processes leading to the development of intracellular α-synuclein (α-syn) inclusions through the nervous system of patients with synucleinopathies are reminiscent of those observed in prion disease progression. Recent studies suggested the existence of common mechanisms underlying the propagation of α-syn and prion protein alterations (Soto *et al.* 2008; Aguzzi 2009; Krammer *et al*. 2009; Miller 2009; Olanow *et al.* 2009; Angot *et al.* 2010; Frost *et al*. 2010). Inspired by transmission studies of prion diseases, we investigated the potential ability of α-syn biochemical alterations to transfer by inoculation from one mouse to another.

MATERIALS AND METHODS

Animal bioassays

For this study, we used a transgenic mouse model of synucleinopathy, named line TgM83, that overexpresses human A53T α-synuclein (B6; C3H-Tg(SNCA)83Vle/J from The Jackson Laboratory) (Giasson *et al.* 2002). After being anaesthetized by iso-fluorane inhalation, 6 weeks old homozygous TgM83 mice were inoculated intracerebrally (i.c.) with 20 µl of 1% brain homogenates obtained either from old symptomatic TgM83 mice or from young TgM83 mice euthanized when 2 months old, well before the onset of clinical signs linked to α-syn pathology. These experimental groups were compared with a cohort of non-inoculated TgM83 mice and with some age-matched controls consisted of non-inoculated TgM83 mice euthanized when 6 months old. Finally, the potential toxicity of the inocula, independently of the transmission of α-syn alterations, was controlled by i.c inoculation of a group of C57Bl/6 mice, presenting a deletion of the α-syn locus (Specht *et al.* 2001), with a brain homogenate from old symptomatic TgM83 mice. The animals were cared for and housed in our approved experimental facilities (n°A69387081), in accordance with the EC Directive 86/609/EEC for animal experiments and with the Regional Committee for Ethical Experimentation on Animals (protocol n°98). Mice were supplied with food and drink *ad libitum* and checked twice a week. Once they presented clinical signs, animals were monitored daily and euthanized by administering a lethal dose of sodium pentobarbital to avoid excessive pain. Brains were removed and stored at -80°C until Western-blot analyses.

Extraction of α-syn

20% brain homogenates were prepared in high salt buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5, 750 mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM DTT) containing 1% phosphatase (Pierce – ref 78428) and protease (Sigma –

P2714) inhibitor cocktails. Samples were centrifuged at low speed (1,000xg – 5 min at +4°C). 200 µl of supernatants were incubated in N-lauroylsarcosyl at a final concentration of 10% before being ultracentrifuged at 465,000xg (1 hour at +4°C) over a 10% sucrose cushion. Pellets (detergent-insoluble / SDS-soluble fraction) were resuspended in 50 µl of TD4215 buffer.

Western-blot analysis

After heat denaturation for 5 minutes at 100°C in TD4215 buffer, proteins from brain extracts were separated by electrophoresis using 15% SDS-polyacrylamide gels before being electroblotted on to PVDF membranes (BioRad). Immunodetection of α-syn was performed with a rabbit mAb that only detects human α-syn phosphorylated on serine 129 [1:1000] (Abcam – ref ab51253). Amounts of proteins loaded by lane were assessed by the detection of GAPDH using a mouse mAb [1:10 000] (Millipore). Membranes were then incubated with HRP-conjugated goat anti-mouse (Pierce ref 32430) or -rabbit (Pierce – ref 32460) secondary antibodies. The immunocomplexes were visualized with chemiluminescent reagents (ECL Amersham), followed by exposure on Biomax MR Kodak films or by analysis using the Versa Doc system (Bio-Rad) and Quantity One software (Bio-Rad). The apparent molecular weights were determined by comparing the positions of the bands with a biotinylated marker (Sigma – B2787).

Statistical analyses

Comparisons of the survival distributions between the experimental groups and the non-inoculated TgM83 controls were assessed by applying Log-Rank tests. Survival curves were obtained by Kaplan-Meier method.

RESULTS

A transgenic mouse model of synucleinopathy named TgM83 (Giasson *et al.* 2002), which spontaneously develops severe motor clinical signs between 10 and 22 months associated with the overexpression of human A53T α-syn, was used for this study (Fig 1). This drastic motor phenotype in aged TgM83 mice, characterized by reduced ambulation linked to partial hind limb paralysis, stiffness of the tail, and prostration, was correlated with cerebral accumulations of pathological α-syn: Western-blot analyses of these symptomatic mice revealed the presence of insoluble forms of α-syn (monomeric form and molecular species with retarded electrophoretic mobility), phosphorylated on serine residue 129 (pSer129 α-syn) (Fig 2).

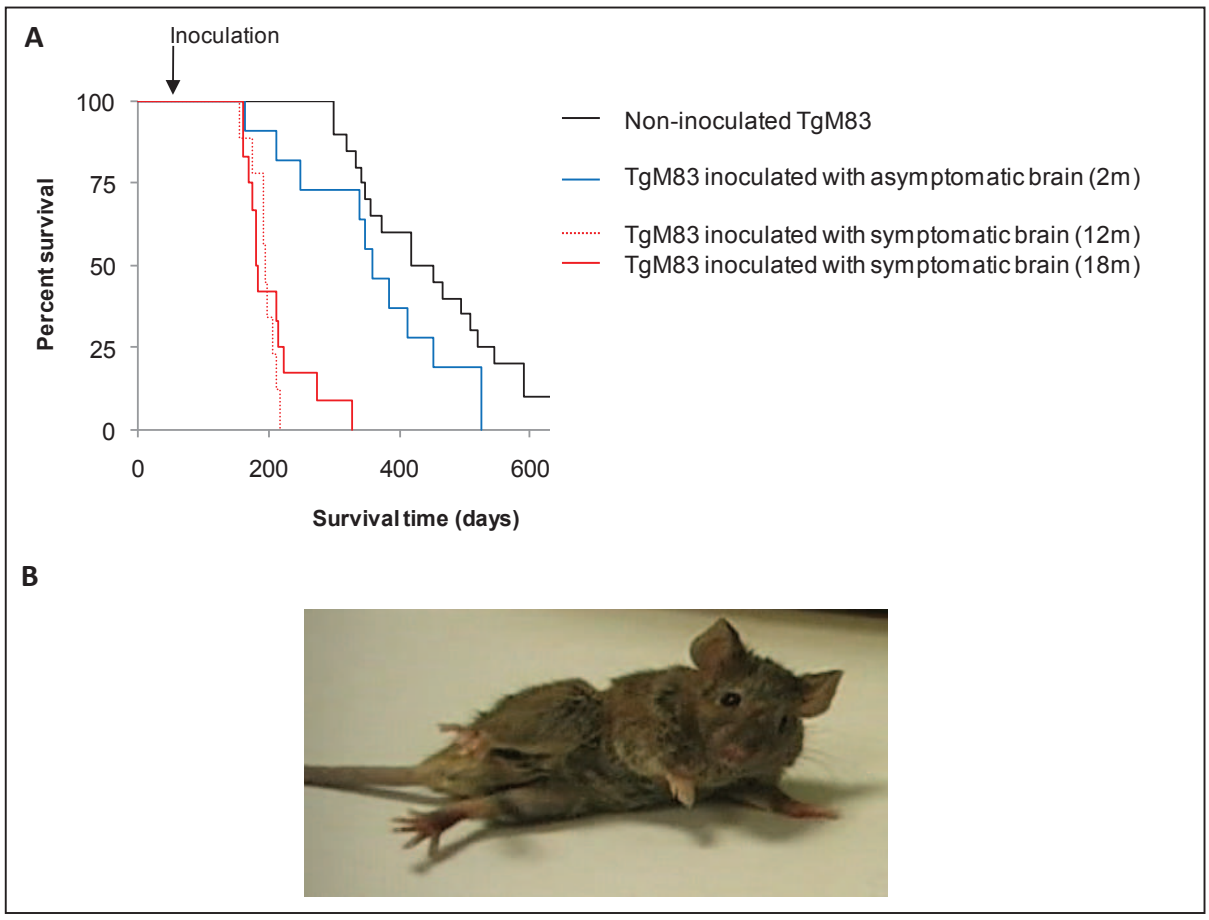


Fig.1: (A) Survival times of TgM83 mice inoculated with brain homogenates containing α-syn alterations from symptomatic mice which died from a synucleinopathy when 12 (red dotted line) or 18 (red continuous line) months old. Another group of TgM83 mice was inoculated with a brain homogenate from an asymptomatic mouse with no α-syn alteration, euthanized when 2 months old (blue continuous line). Non-inoculated TgM83 mice were included as controls (black continuous line). These survival curves were constructed according to the Kaplan-Meier method
(B) Photograph of a 139 day-old TgM83 mouse inoculated with brain homogenate of an aged symtomatic TgM83 mouse. This mouse shows at 97 days post-inoculation an arched back, paralysis of the hind limbs and impaired rotation to upright posture, as described in old uninoculated TgM83 mice

A brain homogenate (10% wt/vol) prepared from an asymptomatic TgM83 mouse, euthanized when 2 months old before the onset of the α-syn pathology, was inoculated intracerebrally (i.c.) into 6 week-old TgM83 mice (Table 1). Western-blot studies of this inoculum did not detect any insoluble pSer129 α-syn, indicating that typical α-syn molecular alterations had not yet occurred in this mouse (Fig 2). Statistical analyses failed to show any significant difference ($p=0.273$) in the distributions of survival times between TgM83 mice inoculated with this brain homogenate from an asymptomatic mouse (median 359 days) and non-inoculated TgM83 mice (median 435 days) (Fig 1, table 1).

Table 1 Medians and ranges of the survival times distributions of TgM83 mice inoculated with brain homogenates containing α-synuclein alterations or not

Hosts and number of mice in the experiments		**Sources of inocula**	**Survival times distributions** Median age at death [min ; max] in days
Non-inoculated TgM83	20	/	435 [298 ; 680]
Inoculated TgM83	11	**Asymptomatic TgM83 (2m)**	359 [162 ; 674] *
	10	**Symptomatic TgM83 (12m)**	193 [154 ; 218]
	12	**Symptomatic TgM83 (18m)**	182 [160 ; 328]
Inoculated C57Bl/6 Δ α-syn	10	**Symptomatic TgM83 (18m)**	**

* The last mouse of this experimental group was still alive after 674 days: this mouse was not considered for the computation of the survival time. The 10th mouse died at 527 days
** All the mice of this experimental group were still alive after 359 days

We then investigated the possible transmission of α-syn alterations in 2 experimental groups of TgM83 mice by challenging them i.c. with 2 different brain homogenates, prepared from 2 TgM83 mice euthanized following the observation of clinical symptoms at 12 and 18 months, respectively. The presence of characteristic molecular alterations of α-syn in each of these 2 mouse brains was confirmed by Western-blot analyses (Fig. 2). No significant difference in the survival time distributions was found between the 2 groups of mice inoculated with brain homogenates from the 2 different old symptomatic TgM83 mice (p=0.464) (Fig 1). Conversely, death in both experimental groups inoculated with altered α-syn occurred significantly earlier than in non-inoculated TgM83 mice ($p<0.0001$ in both cases) (Fig 1). The median survival times were 193 and 182 days (~6 months) respectively, compared to 435 days (~14.5 months) in non-inoculated TgM83 mice (Table 1). Inoculation with TgM83 mouse brain homogenates showing α-syn alterations therefore led to a considerable reduction in survival times and inoculated mice had to be sacrificed ~8.5 months earlier than non-inoculated mice. Moreover, the ranges between death of the first and last TgM83 mice in these 2 experimental groups (154-218 and 160-328 days respectively) were smaller than in the non-inoculated controls (298-680 days) (Table 1).TgM83 mice infected with inocula prepared from old symptomatic TgM83 mice developed clinical signs characteristic of the synucleinopathy in this model.

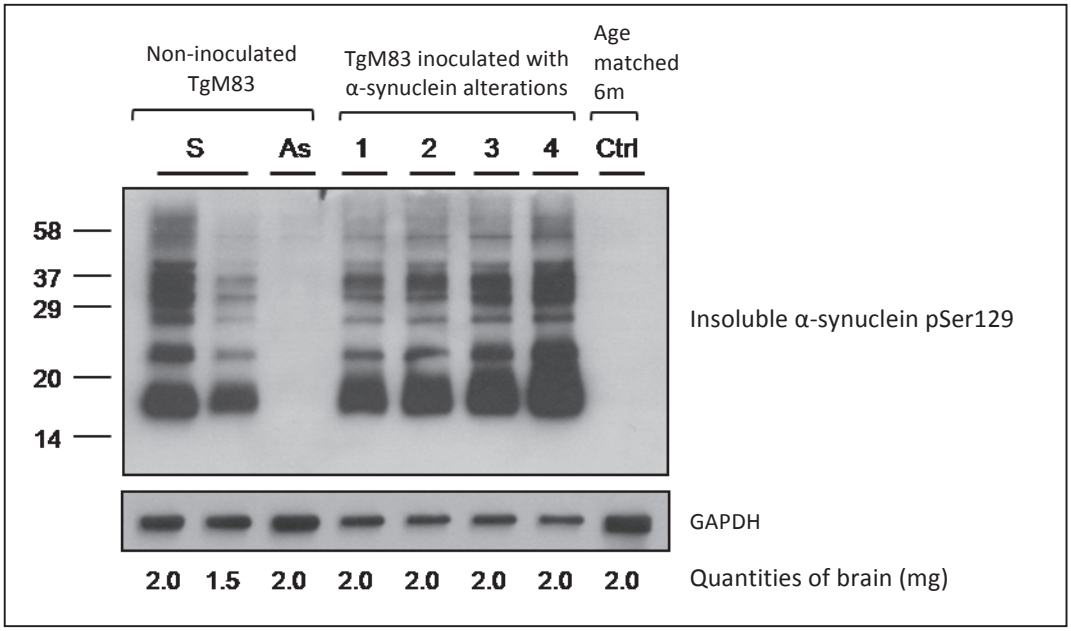


Fig.2: Molecular alterations of α-syn (i.e. accumulation of insoluble and pSer129 species of α-syn) were detected by Western-blot in brain homogenates from non-inoculated **S**ymptomatic TgM83 mice **[S]**. Conversely, no altered form of α-syn was found in brains of **As**ymptomatic, 2 month-old TgM83 mice **[As]**. The alterations of α-syn occurring in 6 month-old TgM83 mice inoculated with brain homogenates bearing a synucleinopathy presented the same molecular features as those previously observed in non-inoculated symptomatic TgM83 mice **[1 to 4]**. Non-inoculated age-matched control (6 month-old TgM83) did not show any pathological forms of α-syn **[ctrl]**. Immunodetection of GAPDH confirmed that comparative amounts of proteins were loaded in the lanes

The early onset of clinical symptoms in TgM83 mice inoculated with brain homogenates carrying altered α-syn was reliably corroborated with the presence of typical molecular features of the α-syn pathology: Western-blot analyses of these inoculated mice revealed an early accumulation of pSer129 α-syn in the detergent-insoluble fraction, with the same molecular features as those previously observed in non-inoculated TgM83 mice euthanized following the development of clinical signs (Fig 2). On the contrary, no molecular alteration of α-syn could be detected in non-inoculated age-matched controls euthanized when 6 months old, before the onset of clinical symptoms (Fig 2).

To further confirm that the early onset of synucleinopathy observed in TgM83 mice inoculated with brain homogenates from symptomatic mice was linked to transmission of the α-syn pathology, C57Bl/6S Δα-syn mice (presenting a natural deletion of the α-syn locus) were challenged with the same inoculum (Table. 1). All mice in this control group, inoculated 11 months ago, are still alive which indicates that the inoculum did not present intrinsic neurotoxicity.

DISCUSSION

The common feature of all synucleinopathies is the accumulation of intracellular aggregates of α-syn that spread throughout the nervous system, causing increasing damage and ultimately cell death. Unlike prion diseases, these neurodegenerative proteinopathies are not transmissible between individuals. However, propagation of the α-syn pathology within the brain of a single patient suggests that α-syn alterations are able to transfer from one cell to another, in a "prion-like" manner (Brundin *et al.* 2008). It has also been hypothesized that PD might originate from the inhalation and/or swallowing of an unknown neurotropic pathogen that would progress from the nose or gut towards the central nervous system via long unmyelinated axons (Braak *et al.* 2003; Braak *et al.* 2004), thereby triggering the propagation of α-syn alterations. According to this theory, this unconventional « prionoid » pathogen would be transferred to the caudal brainstem and temporal lobe before reaching midbrain structures and cortical areas (Hawkes *et al.* 2007; Hawkes *et al.* 2009). In addition, attempts to transplant embryonic dopaminergic neurons in midbrain structures of patients with PD also suggest an intercellular transmission of α-syn alterations: post mortem histological studies of the brains of PD patients who died more than ten years after surgery showed pathological inclusions of α-syn in the grafted neurons. The lesions appearing in the grafted tissue presented the same features as those pre-existing in the diseased host neurons (Li *et al.* 2008; Chu *et al.* 2010), thereby suggesting that the α-syn pathology had gradually progressed from the host tissues to the transplanted neurons (Kordower *et al.* 2008a; Kordower *et al.* 2008b; Li *et al.* 2008).

Little work has been done on α-syn intercellular transfer in animals: as recently mentioned by Angot *et al* (Angot *et al.* 2010), just one study describing the neuron-to-neuron transmission of α-syn following the transplantation of neuronal stem cells into the hippocampus of transgenic mice overexpressing the human α-syn gene, has been published (Desplats *et al.* 2009). We therefore adopted the procedures used to characterize prion diseases to investigate the potential transmissibility of α-syn biochemical alterations by inoculating i.c. a transgenic mouse model of synucleinopathy (TgM83), with brain homogenates of clinically affected mice containing biochemically altered α-syn. The TgM83 murin model is characterized by the onset of a severe motor phenotype during aging, correlated with the development of filamentous intra-neuronal inclusions of α-syn that mirrored many of the histopathological features of human synucleinopathies (Giasson *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002; Waxman *et al.* 2009). In addition, our Western-blot analysis showed that altered α-synuclein extracted from symptomatic TgM83 had the same biochemical characteristic as that observed in the human disease, since it was found detergent-insoluble and phosphorylated on serine residue 129 (Fujiwara *et al.* 2002; Hasegawa *et al.* 2002; Anderson *et al.* 2006). Moreover, a reliable correlation between symptoms development and the detection of insoluble pSer129 α-syn,

including species with retarded electrophoretic mobility, had already been reported in another mouse model of synucleinopathy over-expressing human A30P α-syn (Fournier *et al.* 2009). A striking decrease in survival times of approximately 8.5 months, compared with those of non-inoculated TgM83 mice, was combined with an onset of clinical signs and α-syn biochemical alterations revealed by Western-blot analysis. These typical molecular alterations of α-syn in inoculated TgM83 mice were similar to those developed by uninoculated TgM83 mice at a later age. The acceleration of the α-synuclein pathology in TgM83 mice inoculated with brain homogenates bearing altered α-syn, was reminiscent of a prion-like mechanism of molecular alterations propagation.

Although our findings offer a first insight into the transmission of α-syn alterations in an animal model, other in vitro observations have already highlighted similarities between synucleinopathies and prion diseases. Thus, recent studies have successfully reproduced the induction of intracellular α-syn aggregation in cultured cells: exogenous fibrils added to the culture medium seeded the development of intracellular inclusions via the recruitment of cytoplasmic α-syn expressed by neuroblastoma cells (Danzer *et al.* 2007; Luk *et al.* 2009; Waxman *et al.* 2010) or primary cortical neurons (Danzer *et al.* 2009). Co-culture of donor cells overexpressing tagged α-syn with receptor cells also highlighted the formation of pathological inclusions through neuron-to-neuron transmission of α-syn (Desplats *et al.* 2009).

In conclusion, intracerebral inoculations of transgenic mice overexpressing human mutated α-syn with brain homogenates bearing α-syn alterations triggered a striking early onset of synucleinopathy, indicating that inoculated TgM83 mice could be used to achieve further experiments in a short period of time. The drastic reductions in medians and ranges of the survival times were correlated with the appearance of characteristic clinical signs and biochemical alterations consistent with the α-syn pathology. It is not yet known whether similar results could be obtained in experimental situations where the wild-type human α-syn is expressed. These data suggest that α-syn alterations can be transmitted from one mouse to another, supporting the idea that far from being confined to the TSEs, the “prion-like” propagation of misfolded neuronal proteins might occur in synucleinopathies. As already suggested by findings during the long-term follow-up of neuronal grafts in PD patients, our data imply the potential transmissibility of α-syn alterations through neurosurgical procedures and electrode implantations for deep brain stimulation. They confirm the concept that prion-like mechanisms may be involved in neurodegenerative diseases, as already suggested by similar experimental demonstrations in transgenic mouse models expressing the Alzheimer’s associated tau and β-amyloid human proteins (Meyer-Luehmann *et al.* 2006; Clavaguera *et al.* 2009).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to D. Bétemps, E. Antier, C. Pulido and D. Gaillard for managing or performing the animal experiments. A-L. J. M. was financed by a training grant (CIFRE 2006/1050) from the Association Nationale pour la Recherche et la Technologie.

REFERENCES

Aguzzi, A. (2009). "Cell biology: Beyond the prion principle." Nature 459(7249): 924-5.

Anderson, J. P., Walker, D. E.*, et al.* (2006). "Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease." J Biol Chem 281(40): 29739-52.

Angot, E., Steiner, J. A., *et al*. (2010). "Are synucleinopathies prion-like disorders?" Lancet Neurol.

Braak, H., Ghebremedhin, E., et al. (2004). "Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology." Cell Tissue Res 318(1): 121-34.

Braak, H., Rub, U., *et al.* (2003). "Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen." J Neural Transm 110(5): 517-36.

Brundin, P., Li, J. Y., *et al.* (2008). "Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread." Nat Rev Neurosci 9(10): 741-5.

Chu, Y. and Kordower, J. H. (2010). "Lewy body pathology in fetal grafts." Ann N Y Acad Sci 1184: 55-67.

Clavaguera, F., Bolmont, T., *et al*. (2009). "Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain." Nat Cell Biol 11(7): 909-13.

Danzer, K. M., Haasen, D., *et al*. (2007). "Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding." J Neurosci 27(34): 9220-32.

Danzer, K. M., Krebs, S. K., *et al.* (2009). "Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology." J Neurochem 111(1): 192-203.

Desplats, P., Lee, H. J., *et al.* (2009). "Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein." Proc Natl Acad Sci U S A 106(31): 13010-5.

Fournier, M., Vitte, J., *et al.* (2009). "Parkin deficiency delays motor decline and disease manifestation in a mouse model of synucleinopathy." PLoS One 4(8): e6629.

Frost, B. and Diamond, M. I. (2010). "Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci 11(3): 155-9.

Fujiwara, H., Hasegawa, M.*, et al.* (2002). "alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions." Nat Cell Biol 4(2): 160-4.

Giasson, B. I., Duda, J. E., *et al.* (2002). "Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein." Neuron 34(4): 521-33.

Hasegawa, M., Fujiwara, H., *et al.* (2002). "Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions." J Biol Chem 277(50): 49071-6.

Hawkes, C. H., Del Tredici, K., *et al.* (2007). "Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis." Neuropathol Appl Neurobiol 33(6): 599-614.

Hawkes, C. H., Del Tredici, K., *et al.* (2009). "Parkinson's disease: the dual hit theory revisited." Ann N Y Acad Sci 1170: 615-22.

Kordower, J. H., Chu, Y., *et al.* (2008a). "Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease." Nat Med 14(5): 504-6.

Kordower, J. H., Chu, Y., *et al.* (2008b). "Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report." Mov Disord 23(16): 2303-6.

Krammer, C., Schatzl, H. M., *et al.* (2009). "Prion-like propagation of cytosolic protein aggregates: insights from cell culture models." Prion 3(4): 206-12.

Lee, M. K., Stirling, W., *et al.* (2002). "Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 99(13): 8968-73.

Li, J. Y., Englund, E., *et al.* (2008). "Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation." Nat Med 14(5): 501-3.

Luk, K. C., Song, C., *et al*. (2009). "Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells." Proc Natl Acad Sci U S A 106(47): 20051-6.

Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., *et al.* (2006). "Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host." Science 313(5794): 1781-4.

Miller, G. (2009). "Neurodegeneration. Could they all be prion diseases?" Science 326(5958): 1337-9.

Olanow, C. W. and Prusiner, S. B. (2009). "Is Parkinson's disease a prion disorder?" Proc Natl Acad Sci U S A 106(31): 12571-2.

Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science 216(4542): 136-44.

Soto, C. and Estrada, L. D. (2008). "Protein misfolding and neurodegeneration." Arch Neurol 65(2): 184-9.

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

Waxman, E. A. and Giasson, B. I. (2009). "Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration." Biochim Biophys Acta 1792(7): 616-24.

Waxman, E. A. and Giasson, B. I. (2010). "A novel, high-efficiency cellular model of fibrillar alpha-synuclein inclusions and the examination of mutations that inhibit amyloid formation." J Neurochem 113(2): 374-88.

Conclusion et perspectives

De façon historique, les activités de recherche de l'unité ATNC étaient essentiellement consacrées aux maladies à prion. Le début de ma thèse, en 2007, a correspondu à l'élargissement des thématiques de l'unité vers l'étude d'autres pathologies neurodégénératives et plus particulièrement vers l'analyse des facteurs environnementaux et/ou alimentaires susceptibles d'influencer l'apparition de ces maladies. Ces nouvelles thématiques de recherche s'inscrivent dans la mission de l'anses (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire), qui est tournée vers la mise en œuvre d'une expertise scientifique indépendante et pluraliste, dans le but de contribuer à assurer la sécurité sanitaire humaine dans les domaines de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Afin d'aborder ces nouveaux axes de recherche, mon travail doctoral a débuté par la mise en place d'outils et de techniques permettant la détection spécifique de l'α-synucléine et de ses altérations moléculaires. Dans ce contexte, notre premier objectif a été de développer et de caractériser des anticorps monoclonaux anti α-synucléine humaine.

Les souris C57Bl/6S délétées du gène *snca* permettent l'obtention de taux d'anticorps sériques anti α-synucléine élevés *(article 1)*

Afin de produire des anticorps dirigés contre l'α-synucléine humaine, qui partage une forte homologie de séquence avec la protéine murine (Lavedan 1998), nous avons choisi une stratégie d'immunisation permettant de contourner la tolérance au soi de l'hôte murin. La particularité de ce protocole, inspiré de ce qui avait été préalablement réalisé dans le domaine du prion (Prusiner *et al.* 1993; Betemps *et al.* 2001), réside dans le fait d'utiliser pour hôtes des souris n'exprimant pas de façon endogène l'immunogène. Ces souris, appartenant à une sous-population de C57Bl/6 commercialisée par Harlan, possèdent une délétion naturelle du gène *snca* (Specht *et al.* 2001) et considèrent donc l'α-synucléine recombinante humaine, utilisée pour immunogène, comme une protéine du non-soi. Lors du choix de cette stratégie d'immunisation, nous avons émis l'hypothèse que la reconnaissance par l'hôte murin de l'α-synucléine en tant que protéine étrangère génèrerait une réponse immunitaire, différant de celle obtenue par des protocoles conventionnels sur souris BALB/c, aussi bien quantitativement (en termes de taux d'anticorps produits) que qualitativement (en termes de diversité des épitopes reconnus).

En effet, les résultats du dosage des anticorps anti α-synucléine dans le sérum des souris C57Bl/6S délétées du gène *snca* ont montré que ces hôtes développent effectivement des taux d'immunoglobulines spécifiques circulantes 2 à 3 fois supérieurs à ceux obtenus après immunisation de souris C57Bl/6J sauvages (non-délétées) ou BALB/c avec les mêmes immunogènes (Mougenot *et al.* 2010).

Afin de modifier la présentation de l'immunogène, des pré-traitements acides ou thermiques, connus pour générer des formes oligomériques, ont été appliqués à l'α-synucléine recombinante avant son injection aux souris. La comparaison des réponses immunitaires obtenues après l'immunisation de souris C57Bl/6 délétées ou non du gène *snca* à l'aide d'α-synucléine recombinante pré-traitée ou non, montre que ces traitements n'influencent pas l'immunogénicité de l'α-synucléine : la conformation de cet immunogène a peu d'impact sur l'efficacité de la réponse humorale obtenue (Mougenot *et al.* 2010).

Les anticorps monoclonaux anti α-synucléine obtenus suite à l'immunisation des souris C57Bl/6S délétées du gène *snca* sont majoritairement des IgM *(article 1)*

Trois fusions ont été successivement réalisées à partir de trois souris C57Bl/6S immunisées avec la forme native ou avec la forme fibrillaire de l'α-synucléine : 40 anticorps monoclonaux anti α-synucléine ont ainsi été générés (8 à l'issue de la première fusion, 19 à l'issue de la deuxième et 13 à l'issue de la troisième). La détermination de l'isotype de ces anticorps a révélé qu'une grande majorité d'entre eux est des IgM (Mougenot *et al.* 2010).

Même si cette obtention massive d'IgM reste inexpliquée, nous ne pensons pas qu'elle soit dûe à la faible capacité de l'hôte à générer des IgG : en effet, le dosage des anticorps anti α-synucléine circulants dans le sérum des souris C57Bl/6S suite à leur immunisation a montré qu'elles possèdent des taux d'IgG sériques supérieurs à ceux des souris BALB/c immunisées de la même manière (à l'inverse, les taux d'IgM anti α-synucléine dans le sérum des souris C57Bl/6S sont comparables à ceux des souris BALB/c). Le système immunitaire des souris C57BL/6S est donc bien capable de réaliser la commutation isotypique des immunoglobulines.

Nous pouvons nous questionner sur les éventuelles conséquences de la fusion d'un myélome murin SP2/0 non délété du gène *snca*, avec des splénocytes sécréteurs d'IgG anti α-synucléine issus des souris C57Bl/6S. Cette observation a précédemment été formulée par Williamson dans un article relatant l'immunisation de souris knock-out pour le gène *prnp* avec la forme pathologique de la protéine prion : bien que ces souris sécrètent dans leur sérum des taux importants d'IgG dirigées contre la protéine prion, elles n'ont permis d'obtenir aucun hybridome producteur d'anticorps. L'utilisation pour la fusion de cellules myélomateuses exprimant la protéine prion est citée comme pouvant être un élément susceptible de limiter la survie des clones producteurs d'anticorps anti protéine prion (Williamson *et al.* 1996).

Enfin, nous pensons surtout que c'est l'étape de criblage par ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) des clones producteurs d'anticorps monoclonaux anti α-synucléine qui a conduit à la sélection préférentielle des IgM par rapport aux IgG : en effet, le greffage de l'immunogène au fond

de plaques de microtitration peut légèrement en modifier la conformation. Ainsi, les IgM, grâce à leur pentavalence et à leur faible affinité, ont peut être été plus à même que les IgG à reconnaître une conformation de l'α-synucléine variant sensiblement de celle injectée aux souris.

Parmi cette très grande majorité d'IgM, une IgG a tout de même été sélectionnée. Cet anticorps monoclonal, baptisé AS11, a fait l'objet d'une caractérisation particulière.

L'IgG AS11 reconnait spécifiquement la partie N-terminale de l'α-synucléine humaine soluble ou agrégée *(article 1)*

Contrairement à la majorité des anticorps commerciaux anti α-synucléine qui sont essentiellement dirigés contre la partie C-terminale de la protéine, AS11 reconnait un épitope situé dans les 60 premiers acides-aminés de l'α-synucléine (Mougenot *et al.* 2010).

La caractérisation de l'anticorps AS11 a été réalisée dans les buts de déterminer quelles sont les formes de la protéine reconnues par cet anticorps et quelles sont ses performances dans diverses immunotechniques :

- AS11 peut être utilisé pour la détection spécifique de l'α-synucléine aussi bien avec des techniques préservant la **conformation** des protéines (comme l'immunohistochimie et l'immunofluorescence) qu'avec des techniques biochimiques impliquant une **linéarisation** des protéines (comme le Western-blot en conditions dénaturantes),
- AS11 reconnait **l'α-synucléine humaine sauvage** : (i) en Western-blot, (ii) en immunohistochimie au sein de cerveaux de patients atteints des formes sporadiques de la maladie de Parkinson et de l'atrophie multi-systématisée, (iii) en immunofluorescence sur des cultures de neuroblastomes humains SH-SY5Y. AS11 peut aussi détecter **l'α-synucléine humaine mutée en A53T** : (i) en Western-blot à partir d'homogénats de cerveaux de souris transgéniques TgM83 surexprimant cette forme mutée de l'α-synucléine, (ii) en immunofluorescence sur des cultures de cellules souches murines neurales dérivées de la lignée TgM83,
- AS11 est à la fois spécifique des formes **solubles** (détectées en immunofluorescence sur des cultures de SH-SY5Y ou en Western-blot sur des extraits de cerveaux de souris TgM83 asymptomatiques) et des formes **pathologiques** de l'α-synucléine humaine. En effet, AS11 reconnait l'α-synucléine présente au sein des corps de Lewy ou des inclusions intra-cytoplasmiques, qui sont des structures dont la détection en immunohistochimie est essentielle pour établir les diagnostics de certitude de la maladie de Parkinson et de l'atrophie multi-systématisée (Baba *et al.* 1998; Dickson *et al.* 1999). De même, AS11

détecte en immunofluorescence les corps d'inclusions intra-neuronaux riches en α-synucléine fibrillaire qui apparaissent suite à l'intoxication aiguë par la roténone de neuroblastomes humains SH-SY5Y transduits à l'aide d'adénovirus recombinants pour surexprimer l'α-synucléine humaine.

Via ces essais de caractérisation, nous avons pu confirmer la spécificité d'AS11 pour l'α-synucléine : en effet, aucun signal n'est détecté en immunofluorescence sur des cultures de cellules souches neurales générées à partir d'embryons de souris C57Bl/6S n'exprimant pas l'α-synucléine ; de plus, en Western-blot, aucune bande située vers 20 kDa et pouvant correspondre à l'α-synucléine n'apparaît suite à la détection par AS11 d'homogénats de cerveau de souris C57Bl/6S délétées du gène *snca.* Pour compléter ces données relatives à la spécificité d'AS11, il serait interessant de vérifier l'absence de réaction croisée avec la β- et la γ-synucléines, lesquelles présentent des séquences communes avec l'α-synucléine (George 2002).

Outre les applications immédiates décrites dans notre étude publiée, une perspective possible pour l'anticorps AS11 serait de déterminer s'il peut être un candidat d'intérêt pour une utilisation ultérieure en imagerie médicale, voire en tant qu'anticorps thérapeutique. De telles applications impliquent le clonage, l'expression dans des systèmes procaryotes puis la purification de différents formats d'anticorps recombinants, appelés « intrabodies » car ils ont la capacité de reconnaître des antigènes intracellulaires. Grâce à leurs propriétés pharmacocinétiques de diffusion, d'affinité et de spécificité pour leur antigène, les intrabodies sont des molécules particulièrement adaptées pour réaliser des essais d'immunothérapie ou d'imagerie. Parmi les intrabodies, deux classes de molécules sont plus spécifiquement utilisées dans le cadre de ces applications : ce sont (i) les scFv (pour single chain Variable Fragment) qui sont des molécules monocaténaires dans lesquelles le domaine variable de la chaîne lourde VH est relié au domaine variable de la chaîne légère VL d'immunoglobulines par un peptide ; et (ii) les diabodies qui sont quant à eux des structures reproduisant la bivalence des anticorps natifs par association de deux scFv (Baty *et al.* 2006). Dans le domaine des pathologies liées à l'α-synucléine, plusieurs études *in vitro* décrivent que certains scFV dirigés contre l'α-synucléine sont capables d'inhiber partiellement : d'une part la formation de fibrilles à partir de monomères d'α-synucléine recombinante (Emadi *et al.* 2007) ; et d'autre part, l'apparition d'agrégats intracytoplasmiques au sein de cultures de neuroblastomes (Emadi *et al.* 2007) ou de cellules surexprimant l'α-synucléine humaine sauvage (Zhou *et al.* 2004) ou mutée en A53T (Lynch *et al.* 2008). Ces études sur des cellules en culture montrent également que la réduction de la formation des agrégats par les intrabodies est couplée à la diminution de la toxicité cellulaire liée à l'α-synucléine, amenant une preuve préliminaire de principe d'efficacité des essais d'immunothérapie dans le domaine des synucléinopathies (Zhou *et al.* 2004; Emadi *et al*. 2007; Lynch

et al. 2008; Messer *et al.* 2009). Dans ce contexte, nous pourrions envisager de produire des scFV ou des diabodies à partir de l'anticorps AS11 puis de tester leur potentiel à prévenir la formation de formes agrégées et insolubles de l'α-synucléine, d'abord *in vitro*, sur des cultures de neuroblastomes humains surexprimant l'α-synucléine et traitées à l'aide d'un pesticide neurotoxique ; puis *in vivo*, à l'aide de modèles murins de synucléinopathie. De façon très prospective, nous pourrions aussi imaginer de coupler ces fragments d'anticorps recombinants issus d'AS11 avec des molécules médicamenteuses visant à retarder la formation d'espèces moléculaires toxiques de l'α-synucléine. L'efficacité de ces couples « anticorps/médicaments » serait évaluée *via* leur capacité à retarder la progression d'une pathologie liée à l'α-synucléine dans des modèles cellulaires puis murins développant des synucléinopathies. Le suivi de la progression des altérations de l'α-synucléine pourrait lui-même être réalisé de façon non-invasive et du vivant des animaux, par des techniques d'imagerie de type TEP (pour Tomographie à Emission de Positons) impliquant l'injection de diabodies dérivés d'AS11 et couplés à des marqueurs radioactifs. Une autre hypothèse, très anticipative encore, serait de transfecter des cellules souches embryonnaires murines par des plasmides permettant l'expression stable et la sécrétion de diabodies issus d'AS11. Les éventuels bénéfices de cette thérapie génique cellulaire pourraient être testés *via* l'injection, à des modèles murins de synucléinopathie, de ces cellules souches modifiées permettant la synthèse de diabodies anti α-synucléine directement au cœur des zones cérébrales concernées par le développement de la pathologie liée à l'α-synucléine.

Cette première partie méthodologique, qui a débuté avec la formation d'anticorps monoclonaux anti α-synucléine, s'est poursuivie par la mise en place de techniques biochimiques visant à identifier de façon spécifique les altérations moléculaires de l'α-synucléine.

La détection d'α-synucléine insoluble et phosphorylée en sérine 129 est un critère moléculaire robuste signant une pathologie liée à l'α-synucléine *(articles 2 et 3)*

La mise en évidence des altérations moléculaires de l'α-synucléine caractérisant une synucléinopathie a été réalisée grâce à l'étude des souris transgéniques TgM83 qui développent, au cours de leur vieillissement (entre 10 et 22 mois), une symptomatologie motrice sévère, liée à la surexpression d'α-synucléine humaine mutée en A53T. A partir de ce modèle murin de synucléinopathie, nous avons pu établir une corrélation entre la détection de formes insolubles dans les détergents et phosphorylées en sérine 129 de l'α-synucléine et l'apparition de signes cliniques moteurs spécifiques d'une pathologie liée à l'α-synucléine (raideur puis paralysie du train postérieur

et de la queue, incapacité à se retourner lorsque les souris sont basculées sur le dos). A l'inverse, les souris TgM83 jeunes et asymptomatiques ne présentent pas d'α-synucléine insoluble phosphorylée.

La détection en Western-blot, dans les cerveaux de souris TgM83 symptomatiques, d'α-synucléine insoluble phosphorylée est associée à un profil électrophorétique composé d'une bande majoritaire à ~18.5 kDa puis de bandes présentant une plus faible mobilité électophorétique (entre ~25 et 39 kDa). Ce résultat vient compléter de façon intéressante ceux de Benoît Giasson quant à la caractérisation des espèces moléculaires signant la présence d'altérations de l'α-synucléine dans le modèle TgM83 (Giasson *et al.* 2002) (*cf Fig 9 dans Rappels Bibliographiques*). Un profil moléculaire similaire à celui-ci que nous avons décrit a déjà été rapporté dans un autre modèle murin de synucléinopathie basé sur la surexpression d'α-synucléine humaine mutée en A30P (Fournier *et al.* 2009). De même, la présence de formes insolubles et phosphorylée de l'α-synucléine est aussi observée dans plusieurs synucléinopathies humaines (Fujiwara et al. 2002; Hasegawa et al. 2002; Anderson et al. 2006).

Disposer d'un modèle transgénique récapitulant les aspects moléculaires des synucléinopathies humaines et savoir détecter de façon robuste l'apparition des altérations de l'α-synucléine caractéristiques de ces pathologies, étaient deux pré-requis essentiels à l'investigation de la thématique centrale de ma thèse tournée vers les liens potentiels entre la pathologie moléculaire de l'α-synucléine et les maladies à prion.

Le deuxième objectif de mes travaux doctoraux a été de développer un modèle murin présentant de façon concomitante des formes pathologiques de l'α-synucléine et de la protéine prion. Dans ce but, nous avons inoculé par voie intracérébrale des souris TgM83 avec des homogénats de cerveaux provenant de souris C57Bl/6 infectées avec : une souche de tremblante classique (C506M3), ou avec une souche d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine Classique (ESB-C), ou encore avec une souche d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine de type H (ESB-H).

Les souris TgM83 inoculées avec des homogénats de cerveaux infectés par la tremblante C506M3 ou l'ESB-C meurent précocément de maladie à prion sans présenter d'altération détectable de l'α-synucléine *(article 2)*

Les médianes des durées d'incubation de la tremblante C506M3 et de l'ESB-C après inoculation à des souris TgM83 sont significativement raccourcies de respectivement 23 et 14 jours par rapport à celles observées suite à l'inoculation de ces mêmes souches à des souris C57Bl/6 sauvages ne surexprimant pas l'α-synucléine humaine mutée en A53T. Les souris TgM83 inoculées

avec des homogénats contenant de la tremblante C506M3 ou de l'ESB-C meurent toutes de maladie à prion (détection systématique de PrPd en immunohistochimie ou de PrPres en Western-blot) mais sans avoir eu le temps de développer les altérations de l'α-synucléine préalablement identifiées chez les souris TgM83 âgées, cliniquement atteinte de synucléinopathie (absence d'α-synucléine insoluble phosphorylée en sérine 129 en Western-blot).

Ainsi, l'accélération de la pathologie observée chez les souris TgM83 inoculées avec des homogénats de cerveaux infectés avec de la tremblante ou de l'ESB-C ne semble pas pouvoir être liée à des interactions directes entre la PrPd et les formes insolubles et phosphorylées de l'α-synucléine, lesquelles potentialiseraient les phénomènes neurotoxiques inhérents à ces deux protéines. A l'inverse, ces données ne nous permettent pas d'exclure la possibilité que des interactions moléculaires puissent avoir lieu entre la PrPd et d'autres espèces moléculaires de l'α-synucléine, qui possèderaient une toxicité accrue mais que les techniques actuelles ne permettent pas d'identifier spécifiquement. En effet, les formes les plus cytotoxiques de l'α-synucléine ne sont peut être pas les formes insolubles et phosphorylées en sérine 129 (lesquelles sont par contre, comme démontré précédement, des marqueurs robustes d'un stade avancé de synucléinopathie).

Des formes altérées de l'α-synucléine peuvent être détectées de façon concommitante à la présence de PrPd dans des souris TgM83 inoculées avec un homogénat de cerveau contenant de l'ESB-H *(article 2)*

Les souris TgM83 inoculées par une souche d'ESB-H meurent précocément (médiane des durées d'incubation : 444 jours) par rapport à des souris C57Bl/6 sauvages, c'est-à-dire non-transgéniques, inoculées dans les mêmes conditions (médiane des durées d'incubation : 601 jours).

A l'inverse, les durées de survie des souris TgM83 inoculées par l'ESB-H ne sont pas significativement différentes de celles observées lors du vieillissement des souris TgM83 lorsque celles-ci n'ont pas été inoculées. Ainsi, la durée de survie des TgM83 incoulées avec un homogénat de cerveau contenant de l'ESB-H permet le développement de formes insolubles et phosphorylées en sérine 129 de l'α-synucléine. La présence de ces altérations de l'α-synucléine dans toutes les souris de ce lot expérimental est couplée à l'accumulation de PrPd dans les 4 animaux morts le plus tardivement : des dépôts de PrPd sont détectés dès 515 jours après l'inoculation des souris TgM83 avec l'ESB-H (c'est-à-dire 243 jours plus tôt que chez les souris C57Bl/6 sauvages). Afin de compléter ce résultat, une perspective informative serait de comparer les cinétiques d'accumulation de la PrPd chez des souris TgM83 et chez des souris non-transgéniques pour l'α-synucléine ayant été inoculées avec la même souche d'ESB-H.

Suite aux résultats des inoculations des homogénats de tremblante ou d'ESB-C aux souris TgM83, nous avons précédemement évoqué le fait qu'il nous paraît peu probable que l'accélération de la pathologie observée soit liée à des interactions directes entre la PrPd et l'α-synucléine insoluble.

Les raisons de cette accélération ne semblent pas non plus dues aux changements des proprietés des souches de prion inoculées : en effet, les analyses des profils lésionnels, de l'accumulation cérébrale de PrPd par immunohistochimie et des profils électrophorétiques associés à la PrPres en Western-blot révèlent que les caractéristiques de la tremblante C506M3, de l'ESB-C et de l'ESB-H ne sont pas modifiées après inoculation sur souris TgM83 (par comparaison à la souris C57Bl/6) (Baron *et al.* 2004; Baron *et al.* 2006; Lezmi *et al.* 2006; Biacabe *et al.* 2007; Ritchie *et al.* 2009; Baron *et al.* 2011). Toutefois, le maintien des caractéristiques phénotypiques des souches de prion ne suffit pas totalement pour affirmer que leur virulence n'a pas changé : une étude récente rapporte que le franchissement d'une barrière d'espèces peut induire une variation de la virulence des souches de prion sans modification détectable de la signature biochimique de la PrPres, des profiles lésionnels et de la morphologie des dépôts de PrPd (Espinosa *et al.* 2007). Afin de confirmer que l'accélération de la pathologie observée suite à l'inoculation de différentes souches de prion aux souris TgM83 ne soit pas liée à un gain de virulence, nous pourrions envisager de ré-inoculer ces souches, à l'issue d'un premier passage sur souris TgM83, à leur hôte initial (c'est-à-dire à des souris C57Bl/6).

Aussi, la diminution des temps de survie décrite chez les souris TgM83 suite à leur inoculation par des souches de prion n'est probablement pas non plus causée par leur fond génétique. Les souris TgM83 ont été construites par transgénèse classique à partir de souris B6C3H, elles-même issues de croisements entre les lignées C57Bl/6 et C3H. L'inoculation de souris B6C3H avec de l'ESB-C a montré que ces souris développent cette maladie à prion significativement plus lentement que les souris C57Bl/6 utilisées comme contrôle non-transgénique dans notre étude. Autrement dit, le fond génétique des souris TgM83 n'est donc pas un élément permettant d'expliquer l'accélération de la pathologie que nous avons observée sur ces souris. Cependant, nous ne pouvons pas complètement écarter la faible possibilité selon laquelle la susceptibilité aux ESST ait pu être modifiée par l'insertion du transgène *snca* dans le génome de la lignée TgM83 au moment de sa construction (Lloyd *et al.* 2005).

La surproduction d'α-synucléine humaine mutée en A53T, couplée au développement d'une ESST, peut possiblement engendrer des effets neurotoxiques cumulatifs (comme par exemple la surcharge des systèmes protéolytiques) conduisant à l'aggravation de la neuropathologie observée chez les souris TgM83 inoculées avec des souches de prion (Bennett *et al.* 1999; Eriksen *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2008).

L'inoculation par voie intra-cérébrale d'ESB-H aux souris TgM83 nous a permis d'obtenir un modèle expérimental développant une pathologie neurodégénérative conjointe, caractérisée par la présence de PrPd et d'altérations moléculaires de l'α-synucléine. L'inoculation d'ESB-H n'a provoqué l'accumulation de PrPd que dans une petite moitié des souris TgM83 appartenant à ce groupe expérimental, du fait du faible titre infectieux de l'inoculum utilisé. A l'inverse, les taux d'attaque obtenus suite à l'inoculation de la tremblante C506M3 ou de l'ESB-C à des souris TgM83 sont de 100%. Cependant, ces deux souches de prion ont pour conséquence de provoquer une neurodégénérescence fatale « trop rapide », ne laissant pas le temps aux altérations de l'α-synucléine d'apparaître dans le modèle TgM83. Afin de ralentir la propagation de ces maladies, une des perspectives serait, par exemple, d'envisager d'inoculer des souris TgM83 par voie intra-péritonéale à l'aide de souches de tremblante ou d'ESB-C, ce qui devrait pouvoir permettre une neuroinvasion retardée par rapport à la voie intra-cérébrale (Lasmezas *et al.* 1996), laissant le temps aux formes insolubles et phosphorylées de l'α-synucléine de se développer.

Nous avons choisi de réaliser cette étude sur le modèle murin TgM83 car, comme précédemment décrit, nous disposons de critères moléculaires fiables nous permettant de détecter la présence de formes altérées de l'α-synucléine qui apparaissent de façon corrélée à celle de signes cliniques moteurs évocateurs d'une synucléinoapthie. L'utilisation de ce modèle nous a donc permis d'aisément distinguer les altérations liées à l'α-synucléine de celles inhérentes à la PrPd. Toutefois, il serait aussi pertinent de reproduire ces essais d'inoculation de souches de prion à des souris transgéniques surexprimant la forme sauvage du gène humain de l'α-synucléine (et non sa forme mutée), afin de développer un modèle de co-pathologie reproduisant plus fidèlement les relations pathologiques existant probablement entre l'α-synucléine et la PrPd au cours des formes sporadiques de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

En définitive, disposer de modèles *in vivo* présentant de façon manifeste des altérations pathologiques de la protéine prion et de l'α-synucléine offre la possibilité d'approfondir les relations pouvant exister entre ces deux protéines. Dans ce but, nous envisageons de détecter, par immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de souris TgM83 atteintes de maladie à prion, les dépôts de PrPd et d'α-synucléine afin de déterminer si des phénomènes de colocalisation de ces altérations protéiques apparaissent ou non. Ces résultats pourront être commentés à la lumière des analyses immunohistochimiques préalablement publiées qui ont révélé la détection d'inclusions d'α-synucléine dans des cas d'ESST animales (tremblante naturelle ou expérimentale) (Haik *et al.* 2002; Adjou *et al.* 2007) et humaines (maladie de Creutzfeldt-Jakob) (Haik *et al.* 2002; Vital *et al.* 2007; Kovacs *et al.* 2010b) sans toutefois rapporter des phénomènes de stricte colocalisation de l'α-

synucléine et de la PrPd. Afin de déterminer s'il existe des interactions moléculaires entre l'α-synucléine et la protéine prion, nous planifions de réaliser des essais d'immunocapture de ces protéines : cette technique consiste à mettre en évidence l'existence de complexes protéiques « prion/α-synucléine » à l'aide, par exemple, de microparticules magnétiques greffées avec des anticorps anti prion. Si à l'issue de cette capture la présence d'α-synucléine peut être détectée, cela signifie qu'elle est complexée à la protéine prion avec laquelle elle a été co-immunoprécipitée. C'est d'ailleurs à l'aide d'essais similaires qu'ont été mises en évidence des interactions protéiques entre la PrP et le peptide β-amyloïde (Morales *et al.* 2010).

Le troisième objectif de ma thèse a été d'évaluer *in vivo* le caractère « prion-like » de l'α-synucléine en mettant en place des essais de transmission expérimentale des altérations de l'α-synucléine d'une souris à l'autre. Pour cela, nous nous sommes inspirés des bio-essais visant à caractériser les encéphalopathies spongiformes transmissibles *via* l'inoculation de souches de prion sur des modèles animaux. C'est ainsi que des souris TgM83 âgées de 6 semaines, n'ayant pas encore développé de pathologie liée à l'α-synucléine, ont été inoculées par voie intra-cérébrale avec des homogénats de cerveaux de souris TgM83 euthanasiées suite à l'observation de signes cliniques. Avant d'être inoculés, ces homogénats ont fait l'objet d'une analyse en Western-blot qui a permis de confirmer la présence des formes insolubles et phosphorylées en sérine 129 de l'α-synucléine, que nous avons précédemment décrites comme étant les marqueurs de la maladie.

La durée de survie des souris TgM83 est réduite de façon très importante lorsqu'elles sont inoculées avec des homogénats de cerveaux présentant des altérations d'α-synucléine *(article 3)*

Les souris TgM83 non-inoculées meurent entre 10 et 22 mois, suite à l'apparition d'une symptomatologie motrice sévère liée à la surexpression du gène humain muté en A53T de l'α-synucléine. La médiane des durées de survie d'un lot de 20 souris TgM83 en vieillissement est de 14 mois et demi. Suite à l'inoculation intra-cérébrale à des souris TgM83 âgée de 6 semaines d'homogénats de cerveaux contenant des formes insolubles et phosphorylées de l'α-synucléine, nous avons décrit que la médiane des durée de survie de ce lot expérimental est d'environ 6 mois. Par conséquent, la durée de survie des souris TgM83 est réduite de façon drastique (de 8 mois et demi) lorsqu'elles sont inoculées avec des homogénats de cerveaux eux-mêmes issus de souris TgM83 euthanasiées suite au dévelopement d'une pathologie liée à l'α-synucléine. A l'inverse, l'inoculation de cerveaux de souris TgM83 euthanasiées avant l'apparition de signes cliniques et dépourvues d'α-

synucléine insoluble et phosphorylée ne modifie pas significativement les durées de survie des souris TgM83.

La diminution de la médiane des durées de survie des souris TgM83 inoculées avec des homogénats présentant des altérations de l'α-synucléine est aussi couplée à un rétrécissement du laps de temps dans lequel meurent ces animaux, correspondant à une « synchronisation » des souris au sein du lot inoculé : ainsi, les souris TgM83 non-inoculées ont une durée de surive comprise entre 298 et 680 jours ; alors que les souris TgM83 inoculées vivent entre 154 et 328 jours.

La mort précoce des souris TgM83 inoculées avec des homogénats de cerveaux contenant des altérations de l'α-synucléine correspond à une accélération de la pathologie liée à l'α-synucléine caractéristique de ce modèle murin *(article 3)*

La diminution importante des durées de survie des TgM83, inhérente à l'inoculation de tissus cérébraux porteurs d'altérations de l'α-synucléine, est couplée :

- d'une part à l'apparition précoce des signes cliniques moteurs observés usuellement chez les souris TgM83 non-inoculées à un âge plus tardif (raideur et paralysie partielle du train postérieur et de la queue…),
- d'autre part, à l'apparition précoce des marqueurs moléculaires signant une pathologie liée à l'α-synucléine (détection en Western-blot d'α-synucléine insoluble phosphorylée présentant un profil moléculaire identique à celui observé chez les souris TgM83 non-inoculées à un âge plus tardif).

A l'inverse, l'inoculation de cerveaux de souris TgM83 asymptomatiques, dépourvus d'altérations d'α-synucléine, ne déclenche pas l'accélération de la synucléinopathie caractéristique des souris TgM83.

En conclusion, la transmission expérimentale d'altérations de l'α-synucléine, d'une souris TgM83 à une autre, a permis d'accélérer le développement de la synucléinopathie inhérente à ce modèle murin. Cette induction prématurée de la pathologie liée à l'α-synucléine rappelle la façon dont se propage la PrPd au cours des maladies à prion. Ainsi, cette étude constitue pour nous un premier pas vers la mise en évidence du caractère prion-like de l'α-synucléine et ouvre de nombreuses perspectives. En effet, afin de renforcer ces résultats, nous envisageons de reproduire cette expérimentation en utilisant comme inoculums des cerveaux de souris TgM83 euthanasiées suite à une synucléinopathie, mais déplétés de leur α-synucléine par immunoprécipitation de cette dernière. Si les durées de survie des souris TgM83 ainsi inoculées s'avèrent comparables à celle d'animaux témoins non-inoculés, cet essai permettra de prouver le rôle essentiel des altérations de l'α-synucléine dans l'accélération de la pathologie décrite dans notre 3ème article. Dans ce contexte,

nous planifions aussi d'étudier l'effet-dose des inoculums, en utilisant des cerveaux de souris TgM83 hémizygotes, ou en diluant des homogénats de cerveaux de souris TgM83 à l'aide d'homogénats de cerveaux issus de souris C57Bl/6S délétées du gène de l'α-synucléine. Une autre perspective est d'étudier au cours du temps l'accélération de la neuroinvasion lors de la pathologie liée à l'α-synucléine en mettant en place des lots expérimentaux dans lesquels les souris TgM83 inoculées sont euthanasiées, de façon planifiée, à des intervalles de temps réguliers (tous les mois par exemple). Le développement des altérations de l'α-synucléine peut alors être suivie, à la fois en immunohistochimie et en Western-blot.

Ainsi, le fait de disposer de données plus complètes sur les souris TgM83 présentant une synucléinopathie précoce consécutive à leur inoculation par des tissus portant des altérations de l'α-synucléine, offrira la possibilité d'utiliser ces souris comme un modèle expérimental à part entière : en effet, l'accélération et la synchronisation de l'apparition de la pathologie liée à l'α-synucléine dans ces souris correspondent à l'obtention d'un modèle murin de synucléinopathie, à la fois plus rapide et plus homogène (la variabilité des durées de survie représentant, avec leur longueur, des handicaps majeurs du modèle d'origine).

Aussi, une autre perspective d'intérêt pour l'étude du caractère prion-like de l'α-synucléine consisterait à réaliser des essais d'inoculation d'homogénats de cerveaux contenant des altérations de l'α-synucléine à des souris surexprimant l'α-synucléine humaine sauvage (et non mutée en A53T comme les TgM83), afin de se placer dans des conditions expérimentales plus proches des synucléinopathies humaines, dont les formes sporadiques sont beaucoup plus fréquentes que les formes héréditaires liées à des mutations dans le gène *snca*.

La mise en évidence de la transmissibilité des altérations moléculaires de l'α-synucléine soulève de nombreuses interrogations quant au degré de similitude qui existe entre la propagation de la pathologie liée à l'α-synucléine et celle de la PrPd au cours des maladies à prion. Ainsi, même si aucune donnée publiée ne le suggère actuellement, on peut s'interroger sur l'existence de « souches » d'α-synucléine, de la même manière qu'il existe des souches de prion. Par exemple, nous pourrions imaginer que les différentes mutations ponctuelles du gène *snca,* ou l'exposition à différents pesticides, soient à l'origine d'espèces moléculaires variées de l'α-synucléine, qui se distingueraient les unes des autres par leurs conformations ou par leurs modifications post-traductionnelles. Aussi, nous pouvons spéculer sur la possibilité que ces espèces pourraient être associées à divers degrés de « virulence », révélés par la vitesse à laquelle apparaissent les lésions neurologiques et par l'étendue de celles-ci (zones cérébrales atteintes, perte des neurones dopaminergiques, diminution de la concentration cérébrale de dopamine…).

Pour conclure, le caractère prion-like de l'α-synucléine est un sujet important pour la santé publique, car même s'il n'est pas couplé à un risque épidémique (les synucléinopathies ne sont pas des maladies contagieuses), il a des conséquences notables sur les traitements de la maladie de Parkinson.

Tout d'abord, la propagation des formes pathologiques de l'α-synucléine entre les cellules nerveuses est à l'origine des problèmes d'inefficacité au long court des traitements expérimentaux reposant, entre autres, sur des greffes de neurones qui développent elles aussi *in fine* une pathologie liée à l'α-synucléine (*cf rappels bibliographiques*). De façon prospective, nous pourrions envisager de tester *in vitro* la « résistance » à la propagation des altérations de l'α-synucléine de cellules souches neurales produites à partir d'embryons de souris C57Bl/6S délétés du gène *snca*. Si cette étude préliminaire s'avère concluante, ces cellules souches embryonnaires pourraient ensuite être greffées dans le cerveau de souris transgéniques développant une synucléinopathie (comme par exemple la lignée murine TgM83), afin d'évaluer *in vivo* leur potentiel thérapeutique et leur résistance par rapport à la pathologie liée à l'α-synucléine. Dans l'hypothèse où la délétion du gène de l'α-synucléine s'avère conférer au greffon la possibilité de ne pas être atteint de synucléinopathie, nous pourrions imaginer de mettre en place des essais cliniques chez des patients atteints de la maladie de Parkinson. Ces essais impliqueraient tout d'abord de transformer des cellules souches embryonnaires humaines afin qu'elles ne produisent plus d'α-synucléine endogène (*via* l'invalidation du gène *snca* par recombinaison homologue voire *via* l'intégration dans leur génome de séquences dont la transcription génèrerait des ARN interférants, lesquels auraient la capacité de bloquer la traduction des ARNm codant pour l'α-synucléine). Après prolifération, ces cellules pourraient faire l'objet d'essais expérimentaux de greffes dans le striatum des patients parkinsoniens. Cette hypothèse thérapeutique, bien qu'extrêmement anticipative, serait peut être concevable compte tenu de l'absence de phénotype pathologique majeur liée à la délétion ou l'invalidation par recombinaison homologue du gène *snca* chez les souris (Specht *et al.* 2001; Cabin *et al.* 2002). De plus, dans le domaine des encéphalopathies subaiguës transmissibles cette fois-ci, des essais préliminaires du même ordre ont permis de montrer *in vivo* que les cellules n'exprimant pas la PrPc sont résistantes à une infection par des maladies à prion (Bueler *et al.* 1993; Brandner *et al.* 1996).

La mise en évidence du caractère transmissible des altérations de l'α-synucléine nous amène également à nous questionner quant aux éventuelles conséquences, en termes de « dissémination d'espèces toxiques de l'α-synucléine », que pourraient avoir les traitements basés sur l'implantation d'électrodes de stimulation intra-cérébrales (*cf rappels bibliographiques*).

Enfin, la compréhension des mécanismes impliqués dans la transmission des altérations de l'α-synucléine est importante car elle permettra peut-être d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi d'envisager de nouveaux traitements visant à ralentir la progression des

pathologies liées à l'α-synucléine. Aussi, la mise en évidence de certaines similitudes entre les pathogénicités de la PrPd et de l'α-synucléine pathologique offrira hypothétiquement la possibilité de transposer, du domaine des maladies à prion à celui des synucléinopathies, ou l'inverse, certaines pistes thérapeutiques ayant donné lieu à des résultats préliminaires prometteurs. Ce peut être par exemple le cas de protocoles expérimentaux d'immunisation génétique à l'aide d'ADN complémentaire (ADNc) qui sont en cours d'évaluation dans le champ des ESSTs mais qui n'ont pas encore été investigués, à ma connaissance, dans le cadre des pathologies liées à l'α-synucléine. Cette stratégie consiste à injecter à des souris sauvages de l'ADNc codant pour un immunogène (dans ce cas, la protéine prion humaine) qui diffère légèrement de son homologue murin. Les souris ainsi vaccinées développent non seulement des anticorps reconnaissant l'immunogène, mais aussi des autoanticorps spécifiques de la protéine endogène à des taux significatifs (Alexandrenne *et al.* 2010). Ces essais préliminaires ouvriront possiblement la voie à l'étude du potentiel protecteur des autoanticorps ainsi générés et seront peut être les premiers pas vers l'évaluation de traitements prophylactiques des protéinopathies neurodégénératives.

* * *

Références bibliographiques

(2000). Conférence de consensus sur les critères diagnostiques et thérapeutiques de la Maladie de Parkinson, Hôpital de la Pitié Salpétrière - Paris, ANAES.

Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D. and Rosenthal, A. (2000). "Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system." Neuron **25**(1): 239-52.

Adjou, K. T., Allix, S., Ouidja, M. O., Backer, S., Couquet, C., Cornuejols, M. J., Deslys, J. P., Brugere, H., Brugere-Picoux, J. and El-Hachimi, K. H. (2007). "Alpha-synuclein accumulates in the brain of scrapie-affected sheep and goats." J Comp Pathol **137**(1): 78-81.

Aguzzi, A. (2001). "Peripheral prion pursuit." J Clin Invest **108**(5): 661-2.

Aguzzi, A. (2009). "Cell biology: Beyond the prion principle." Nature **459**(7249): 924-5.

Aguzzi, A. and Polymenidou, M. (2004). "Mammalian prion biology: one century of evolving concepts." Cell **116**(2): 313-27.

Aguzzi, A. and Rajendran, L. (2009). "The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids." Neuron **64**(6): 783-90.

Aguzzi, A., Sigurdson, C. and Heikenwaelder, M. (2008). "Molecular mechanisms of prion pathogenesis." Annu Rev Pathol **3**: 11-40.

Ahn, B. H., Rhim, H., Kim, S. Y., Sung, Y. M., Lee, M. Y., Choi, J. Y., Wolozin, B., Chang, J. S., Lee, Y. H., Kwon, T. K., Chung, K. C., Yoon, S. H., Hahn, S. J., Kim, M. S., Jo, Y. H. and Min, D. S. (2002). "alpha-Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells." J Biol Chem **277**(14): 12334-42.

Ahn, K. J., Paik, S. R., Chung, K. C. and Kim, J. (2006). "Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein." J Neurochem **97**(1): 265-79.

Alam, M. and Schmidt, W. J. (2002). "Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats." Behav Brain Res **136**(1): 317-24.

Alexandrenne, C., Wijkhuisen, A., Dkhissi, F., Hanoux, V., Priam, F., Allard, B., Boquet, D. and Couraud, J. Y. (2010). "Electrotransfer of cDNA coding for a heterologous prion protein generates autoantibodies against native murine prion protein in wild-type mice." DNA Cell Biol **29**(3): 121-31.

Anderson, J. P., Walker, D. E., Goldstein, J. M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R. J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P. S., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M. G., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S., Gai, W. P. and Chilcote, T. J. (2006). "Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease." J Biol Chem **281**(40): 29739-52.

Angot, E. and Brundin, P. (2009). "Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **15 Suppl 3**: S143-7.

Angot, E., Steiner, J. A., Hansen, C., Li, J. Y. and Brundin, P. (2010). "Are synucleinopathies prion-like disorders?" Lancet Neurol.

Arias-Carrion, O. and Yuan, T. F. (2009). "Autologous neural stem cell transplantation: a new treatment option for Parkinson's disease?" Med Hypotheses **73**(5): 757-9.

Asuni, A. A., Hilton, K., Siskova, Z., Lunnon, K., Reynolds, R., Perry, V. H. and O'Connor, V. (2009). "Alpha-Synuclein deficiency in the C57BL/6JOlaHsd strain does not modify disease progression in the ME7-model of prion disease." Neuroscience.

Aucouturier, P., Geissmann, F., Damotte, D., Saborio, G. P., Meeker, H. C., Kascsak, R., Carp, R. I. and Wisniewski, T. (2001). "Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie." J Clin Invest **108**(5): 703-8.

Baba, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. and Iwatsubo, T. (1998). "Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." Am J Pathol **152**(4): 879-84.

Barker, W. W., Luis, C. A., Kashuba, A., Luis, M., Harwood, D. G., Loewenstein, D., Waters, C., Jimison, P., Shepherd, E., Sevush, S., Graff-Radford, N., Newland, D., Todd, M., Miller, B., Gold, M., Heilman, K., Doty, L., Goodman, I., Robinson, B., Pearl, G., Dickson, D. and Duara, R. (2002). "Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank." Alzheimer Dis Assoc Disord **16**(4): 203-12.

Baron, T., Biacabe, A. G., Arsac, J. N., Benestad, S. and Groschup, M. H. (2007). "Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants." Vaccine **25**(30): 5625-30.

Baron, T., Crozet, C., Biacabe, A. G., Philippe, S., Verchere, J., Bencsik, A., Madec, J. Y., Calavas, D. and Samarut, J. (2004). "Molecular analysis of the protease-resistant prion protein in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice." J Virol **78**(12): 6243-51.

Baron, T., Vulin, J., Biacabe, A. G., Lakhdar, L., Verchere, J., Torres, J. M. and Bencsik, A. (2011). "Emergence of classical BSE strain properties during serial passage of H-BSE in wild-type mice." PLoS One **6**(1): e15839.

Baron, T. G., Biacabe, A. G., Bencsik, A. and Langeveld, J. P. (2006). "Transmission of new bovine prion to mice." Emerg Infect Dis **12**(7): 1125-8.

Baty, D. and Chames, P. (2006). "Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunothérapie." Immuno-analyse et Biologie spécialisée **21**: 225-263.

Beal, M. F. (2001). "Experimental models of Parkinson's disease." Nat Rev Neurosci **2**(5): 325-34.

Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M. A. and Bratberg, B. (2003). "Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98." Vet Rec **153**(7): 202-8.

Bennett, M. C. (2005). "The role of alpha-synuclein in neurodegenerative diseases." Pharmacol Ther **105**(3): 311-31.

Bennett, M. C., Bishop, J. F., Leng, Y., Chock, P. B., Chase, T. N. and Mouradian, M. M. (1999). "Degradation of alpha-synuclein by proteasome." J Biol Chem **274**(48): 33855-8.

Beranger, F., Mange, A. and Lehmann, S. (2003). "[Scrapie, proteasome and endoplasmic reticulum]." Med Sci (Paris) **19**(8-9): 778-80.

Betarbet, R., Sherer, T. B. and Greenamyre, J. T. (2002). "Animal models of Parkinson's disease." Bioessays **24**(4): 308-18.

Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V. and Greenamyre, J. T. (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." Nat Neurosci **3**(12): 1301-6.

Betemps, D. and Baron, T. (2001). "Molecular specificities of antibodies against ovine and murine recombinant prion proteins." Biochem Biophys Res Commun **281**(1): 101-8.

Beyer, K. (2006). "Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers." Acta Neuropathol (Berl) **112**(3): 237-51.

Biacabe, A. G., Jacobs, J. G., Bencsik, A., Langeveld, J. P. and Baron, T. G. (2007). "H-type bovine spongiform encephalopathy: complex molecular features and similarities with human prion diseases." Prion **1**(1): 61-8.

Biacabe, A. G., Laplanche, J. L., Ryder, S. and Baron, T. (2004). "Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases." EMBO Rep **5**(1): 110-5.

Bibl, M., Esselmann, H., Lewczuk, P., Trenkwalder, C., Otto, M., Kornhuber, J., Wiltfang, J. and Mollenhauer, B. (2010). "Combined Analysis of CSF Tau, Abeta42, Abeta1-42% and Abeta1-40% in Alzheimer's Disease, Dementia with Lewy Bodies and Parkinson's Disease Dementia." Int J Alzheimers Dis **2010**.

Biere, A. L., Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Jiang, Y., Anafi, D., Jacobsen, F. W., Jarosinski, M. A., Wu, G. M., Louis, J. C., Martin, F., Narhi, L. O. and Citron, M. (2000). "Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is more fibrillogenic than beta- and gamma-synuclein and cannot cross-seed its homologs." J Biol Chem **275**(44): 34574-9.

Bjorklund, A. (2000). "Cell replacement strategies for neurodegenerative disorders." Novartis Found Symp **231**: 7-15; discussion 16-20.

Bjorklund, A., Dunnett, S. B., Brundin, P., Stoessl, A. J., Freed, C. R., Breeze, R. E., Levivier, M., Peschanski, M., Studer, L. and Barker, R. (2003). "Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease." Lancet Neurol **2**(7): 437-45.

Bonini, N. M. and Giasson, B. I. (2005). "Snaring the function of alpha-synuclein." Cell **123**(3): 359-61.

Borland, M. K., Trimmer, P. A., Rubinstein, J. D., Keeney, P. M., Mohanakumar, K., Liu, L. and Bennett, J. P., Jr. (2008). "Chronic, low-dose rotenone reproduces Lewy neurites found in early stages of Parkinson's disease, reduces mitochondrial movement and slowly kills differentiated SH-SY5Y neural cells." Mol Neurodegener **3**: 21.

Bove, J., Zhou, C., Jackson-Lewis, V., Taylor, J., Chu, Y., Rideout, H. J., Wu, D. C., Kordower, J. H., Petrucelli, L. and Przedborski, S. (2006). "Proteasome inhibition and Parkinson's disease modeling." Ann Neurol **60**(2): 260-4.

Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1996). "Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity." Nature **379**(6563): 339-43.

Brighina, L., Frigerio, R., Schneider, N. K., Lesnick, T. G., de Andrade, M., Cunningham, J. M., Farrer, M. J., Lincoln, S. J., Checkoway, H., Rocca, W. A. and Maraganore, D. M. (2008). "Alpha-synuclein, pesticides, and Parkinson disease: a case-control study." Neurology **70**(16 Pt 2): 1461-9.

Brooks, A. I., Chadwick, C. A., Gelbard, H. A., Cory-Slechta, D. A. and Federoff, H. J. (1999). "Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss." Brain Res **823**(1-2): 1-10.

Bruce, M. E. and Fraser, H. (1991). "Scrapie strain variation and its implications." Curr Top Microbiol Immunol **172**: 125-38.

Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. and Bostock, C. J. (1997). "Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent." Nature **389**(6650): 498-501.

Brundin, P., Li, J. Y., Holton, J. L., Lindvall, O. and Revesz, T. (2008). "Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread." Nat Rev Neurosci **9**(10): 741-5.

Brundin, P., Melki, R. and Kopito, R. (2010). "Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4): 301-7.

Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C. (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." Cell **73**(7): 1339-47.

Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. and Weissmann, C. (1992). "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein." Nature **356**(6370): 577-82.

Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C. E., Paylor, R., Lu, B. and Nussbaum, R. L. (2002). "Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein." J Neurosci **22**(20): 8797-807.

Cannon, J. R., Tapias, V., Na, H. M., Honick, A. S., Drolet, R. E. and Greenamyre, J. T. (2009). "A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease." Neurobiol Dis **34**(2): 279-90.

Cappai, R., Leck, S. L., Tew, D. J., Williamson, N. A., Smith, D. P., Galatis, D., Sharples, R. A., Curtain, C. C., Ali, F. E., Cherny, R. A., Culvenor, J. G., Bottomley, S. P., Masters, C. L., Barnham, K. J. and Hill, A. F. (2005). "Dopamine promotes alpha-synuclein aggregation into SDS-resistant soluble oligomers via a distinct folding pathway." FASEB J **19**(10): 1377-9.

Carp, R. I. and Callahan, S. M. (1991). "Variation in the characteristics of 10 mouse-passaged scrapie lines derived from five scrapie-positive sheep." J Gen Virol **72 (Pt 2)**: 293-8.

Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S. and Caramelli, M. (2004). "Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3065-70.

Chandra, S., Gallardo, G., Fernandez-Chacon, R., Schluter, O. M. and Sudhof, T. C. (2005). "Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration." Cell **123**(3): 383-96.

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

Chaves, R. S., Melo, T. Q., Martins, S. A. and Ferrari, M. F. (2010). "Protein aggregation containing beta-amyloid, alpha-synuclein and hyperphosphorylated tau in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure." BMC Neurosci **11**(1): 144.

Chen, M., Margittai, M., Chen, J. and Langen, R. (2007). "Investigation of alpha-synuclein fibril structure by site-directed spin labeling." J Biol Chem **282**(34): 24970-9.

Chen, X., de Silva, H. A., Pettenati, M. J., Rao, P. N., St George-Hyslop, P., Roses, A. D., Xia, Y., Horsburgh, K., Ueda, K. and Saitoh, T. (1995). "The human NACP/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis." Genomics **26**(2): 425-7.

Chesebro, B., Wehrly, K., Caughey, B., Nishio, J., Ernst, D. and Race, R. (1993). "Foreign PrP expression and scrapie infection in tissue culture cell lines." Dev Biol Stand **80**: 131-40.

Chiesa, R., Piccardo, P., Quaglio, E., Drisaldi, B., Si-Hoe, S. L., Takao, M., Ghetti, B. and Harris, D. A. (2003). "Molecular distinction between pathogenic and infectious properties of the prion protein." J Virol **77**(13): 7611-22.

Choi, J. G., Kim, H. G., Kim, M. C., Yang, W. M., Huh, Y., Kim, S. Y. and Oh, M. S. (2010). "Polygalae radix inhibits toxin-induced neuronal death in the Parkinson's disease models." J Ethnopharmacol.

Chou, A. P., Li, S., Fitzmaurice, A. G. and Bronstein, J. M. (2010). "Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition." Neurotoxicology **31**(4): 367-72.

Chu, Y. and Kordower, J. H. (2007). "Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease?" Neurobiol Dis **25**(1): 134-49.

Chu, Y. and Kordower, J. H. (2010). "Lewy body pathology in fetal grafts." Ann N Y Acad Sci **1184**: 55-67.

Clarke, M. C. and Haig, D. A. (1971). "Multiplication of scrapie agent in mouse spleen." Res Vet Sci **12**(2): 195-7.

Clayton, D. F. and George, J. M. (1998). "The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease." Trends Neurosci **21**(6): 249-54.

Clayton, D. F. and George, J. M. (1999). "Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders." J Neurosci Res **58**(1): 120-9.

Conway, K. A., Harper, J. D. and Lansbury, P. T. (1998). "Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease." Nat Med **4**(11): 1318-20.

Conway, K. A., Harper, J. D. and Lansbury, P. T., Jr. (2000a). "Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid." Biochemistry **39**(10): 2552-63.

Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E. and Lansbury, P. T., Jr. (2000b). "Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 571-6.

Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M. and Lansbury, P. T., Jr. (2001). "Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct." Science **294**(5545): 1346-9.

Cookson, M. R. (2009). "alpha-Synuclein and neuronal cell death." Mol Neurodegener **4**: 9.

Cookson, M. R. and van der Brug, M. (2008). "Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein." Exp Neurol **209**(1): 5-11.

Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K. E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Marsischky, G., Kolodner, R. D., Labaer, J., Rochet, J. C., Bonini, N. M. and Lindquist, S. (2006). "Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models." Science **313**(5785): 324-8.

Crowther, R. A., Daniel, S. E. and Goedert, M. (2000). "Characterisation of isolated alpha-synuclein filaments from substantia nigra of Parkinson's disease brain." Neurosci Lett **292**(2): 128-30.

Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T. and Sulzer, D. (2004). "Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy." Science **305**(5688): 1292-5.

Cushman, M., Johnson, B. S., King, O. D., Gitler, A. D. and Shorter, J. (2010). "Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity." J Cell Sci **123**(Pt 8): 1191-201.

Damier, P., Hirsch, E. C., Agid, Y. and Graybiel, A. M. (1999). "The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease." Brain **122 (Pt 8)**: 1437-48.

Danzer, K. M., Haasen, D., Karow, A. R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretzschmar, H., Hengerer, B. and Kostka, M. (2007). "Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding." J Neurosci **27**(34): 9220-32.

Danzer, K. M., Krebs, S. K., Wolff, M., Birk, G. and Hengerer, B. (2009). "Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology." J Neurochem **111**(1): 192-203.

Dauer, W. and Przedborski, S. (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.

Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F. and George, J. M. (1998). "Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes." J Biol Chem **273**(16): 9443-9.

Debeer, S., Baron, T. and Bencsik, A. (2003). "Neuropathological characterisation of French bovine spongiform encephalopathy cases." Histochem Cell Biol **120**(6): 513-21.

Defebvre, L. and Verin, M. (2006). "La maladie de Parkinson." Edition Massons **Monographies de Neurologie**(Etiopathogénie): 11-21.

Deglon, N., Tseng, J. L., Bensadoun, J. C., Zurn, A. D., Arsenijevic, Y., Pereira de Almeida, L., Zufferey, R., Trono, D. and Aebischer, P. (2000). "Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease." Hum Gene Ther **11**(1): 179-90.

Desplats, P., Lee, H. J., Bae, E. J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E. and Lee, S. J. (2009). "Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 13010-5.

Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G. and Anandatheerthavarada, H. K. (2008). "Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain." J Biol Chem **283**(14): 9089-100.

Dickinson, A. G. and Meikle, V. M. (1969). "A comparison of some biological characteristics of the mouse-passaged scrapie agents, 22A and ME7." Genet Res **13**(2): 213-25.

Dickson, D. W., Braak, H., Duda, J. E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G. M., Hardy, J., Leverenz, J. B., Del Tredici, K., Wszolek, Z. K. and Litvan, I. (2009). "Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria." Lancet Neurol **8**(12): 1150-7.

Dickson, D. W., Liu, W., Hardy, J., Farrer, M., Mehta, N., Uitti, R., Mark, M., Zimmerman, T., Golbe, L., Sage, J., Sima, A., D'Amato, C., Albin, R., Gilman, S. and Yen, S. H. (1999). "Widespread alterations of alpha-synuclein in multiple system atrophy." Am J Pathol **155**(4): 1241-51.

Dickson, D. W., Ruan, D., Crystal, H., Mark, M. H., Davies, P., Kress, Y. and Yen, S. H. (1991). "Hippocampal degeneration differentiates diffuse Lewy body disease (DLBD) from Alzheimer's disease: light and electron microscopic immunocytochemistry of CA2-3 neurites specific to DLBD." Neurology **41**(9): 1402-9.

Ding, T. T., Lee, S. J., Rochet, J. C. and Lansbury, P. T., Jr. (2002). "Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes." Biochemistry **41**(32): 10209-17.

Duda, J. E., Giasson, B. I., Mabon, M. E., Miller, D. C., Golbe, L. I., Lee, V. M. and Trojanowski, J. Q. (2002). "Concurrence of alpha-synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred." Acta Neuropathol **104**(1): 7-11.

Dupiereux, I., Zorzi, W., Quadrio, I., Perret-Liaudet, A., Kovacs, G. G., Heinen, E. and Elmoualij, B. (2009). "Creutzfeldt-jakob, Parkinson, lewy body dementia and Alzheimer diseases: from diagnosis to therapy." Cent Nerv Syst Agents Med Chem **9**(1): 2-11.

El-Agnaf, O. M., Salem, S. A., Paleologou, K. E., Curran, M. D., Gibson, M. J., Court, J. A., Schlossmacher, M. G. and Allsop, D. (2006). "Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease." Faseb J **20**(3): 419-25.

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

Emadi, S., Barkhordarian, H., Wang, M. S., Schulz, P. and Sierks, M. R. (2007). "Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity." J Mol Biol **368**(4): 1132-44.

Emmanouilidou, E., Stefanis, L. and Vekrellis, K. (2010). "Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome." Neurobiol Aging **31**(6): 953-68.

Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. and Kobata, A. (1989). "Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein." Biochemistry **28**(21): 8380-8.

Eriksen, J. L., Dawson, T. M., Dickson, D. W. and Petrucelli, L. (2003). "Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease." Neuron **40**(3): 453-6.

Espinosa, J. C., Andreoletti, O., Castilla, J., Herva, M. E., Morales, M., Alamillo, E., San-Segundo, F. D., Lacroux, C., Lugan, S., Salguero, F. J., Langeveld, J. and Torres, J. M. (2007). "Sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent exhibits altered pathobiological properties in bovine-PrP transgenic mice." J Virol **81**(2): 835-43.

Feany, M. B. and Bender, W. W. (2000). "A Drosophila model of Parkinson's disease." Nature **404**(6776): 394-8.

Fernagut, P. O. and Chesselet, M. F. (2004). "Alpha-synuclein and transgenic mouse models." Neurobiol Dis **17**(2): 123-30.

Forno, L. S. (1996). "Neuropathology of Parkinson's disease." J Neuropathol Exp Neurol **55**(3): 259-72.

Fortin, D. L., Nemani, V. M., Voglmaier, S. M., Anthony, M. D., Ryan, T. A. and Edwards, R. H. (2005). "Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein." J Neurosci **25**(47): 10913-21.

Foulds, P., Mann, D. M., Mitchell, J. D. and Allsop, D. (2010). "Parkinson disease: Progress towards a molecular biomarker for Parkinson disease." Nat Rev Neurol **6**(7): 359-61.

Fournier, M., Vitte, J., Garrigue, J., Langui, D., Dullin, J. P., Saurini, F., Hanoun, N., Perez-Diaz, F., Cornilleau, F., Joubert, C., Ardila-Osorio, H., Traver, S., Duchateau, R., Goujet-Zalc, C., Paleologou, K., Lashuel, H. A., Haass, C., Duyckaerts, C., Cohen-Salmon, C., Kahle, P. J., Hamon, M., Brice, A. and Corti, O. (2009). "Parkin deficiency delays motor decline and disease manifestation in a mouse model of synucleinopathy." PLoS One **4**(8): e6629.

Fraser, H. and Dickinson, A. G. (1968). "The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice." J Comp Pathol **78**(3): 301-11.

Frost, B. and Diamond, M. I. (2010). "Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci **11**(3): 155-9.

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

Gai, W. P., Power, J. H., Blumbergs, P. C., Culvenor, J. G. and Jensen, P. H. (1999). "Alpha-synuclein immunoisolation of glial inclusions from multiple system atrophy brain tissue reveals multiprotein components." J Neurochem **73**(5): 2093-100.

Gai, W. P., Yuan, H. X., Li, X. Q., Power, J. T., Blumbergs, P. C. and Jensen, P. H. (2000). "In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies." Exp Neurol **166**(2): 324-33.

Galvin, J. E., Lee, V. M. and Trojanowski, J. Q. (2001a). "Synucleinopathies: clinical and pathological implications." Arch Neurol **58**(2): 186-90.

Galvin, J. E., Schuck, T. M., Lee, V. M. and Trojanowski, J. Q. (2001b). "Differential expression and distribution of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in the developing human substantia nigra." Exp Neurol **168**(2): 347-55.

Gao, H. M., Zhang, F., Zhou, H., Kam, W., Wilson, B. and Hong, J. S. (2011). "Neuroinflammation and alpha-Synuclein Dysfunction Potentiate Each Other Driving Chronic Progression of Neurodegeneration in a Mouse Model of Parkinson's Disease." Environ Health Perspect.

Gelb, D. J., Oliver, E. and Gilman, S. (1999). "Diagnostic criteria for Parkinson disease." Arch Neurol **56**(1): 33-9.

Gentile, A., Amadoro, G., Corsetti, V., Ciotti, M. T., Serafino, A. and Calissano, P. (2008). "Spontaneous Aggregation and Altered Intracellular Distribution of Endogenous alpha-Synuclein During Neuronal Apoptosis." J Alzheimers Dis **13**(2): 151-60.

George, J. M. (2002). "The synucleins." Genome Biol **3**(1): REVIEWS3002.

George, J. M., Jin, H., Woods, W. S. and Clayton, D. F. (1995). "Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch." Neuron **15**(2): 361-72.

George, S., van den Buuse, M., San Mok, S., Masters, C. L., Li, Q. X. and Culvenor, J. G. (2008). "alpha-Synuclein transgenic mice exhibit reduced anxiety-like behaviour." Exp Neurol **210**(2): 788-792.

Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2000). "Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions." Science **290**(5493): 985-9.

Giasson, B. I., Duda, J. E., Quinn, S. M., Zhang, B., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2002). "Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein." Neuron **34**(4): 521-33.

Giasson, B. I., Forman, M. S., Higuchi, M., Golbe, L. I., Graves, C. L., Kotzbauer, P. T., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2003). "Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein." Science **300**(5619): 636-40.

Giasson, B. I., Murray, I. V., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2001). "A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly." J Biol Chem **276**(4): 2380-6.

Giasson, B. I., Uryu, K., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (1999). "Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro." J Biol Chem **274**(12): 7619-22.

Gilman, S., Wenning, G. K., Low, P. A., Brooks, D. J., Mathias, C. J., Trojanowski, J. Q., Wood, N. W., Colosimo, C., Durr, A., Fowler, C. J., Kaufmann, H., Klockgether, T., Lees, A., Poewe, W., Quinn, N., Revesz, T., Robertson, D., Sandroni, P., Seppi, K. and Vidailhet, M. (2008). "Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy." Neurology **71**(9): 670-6.

Goedert, M. (1997). "Familial Parkinson's disease. The awakening of alpha-synuclein." Nature **388**(6639): 232-3.

Goedert, M., Clavaguera, F. and Tolnay, M. (2010). "The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases." Trends Neurosci **33**(7): 317-25.

Goers, J., Manning-Bog, A. B., McCormack, A. L., Millett, I. S., Doniach, S., Di Monte, D. A., Uversky, V. N. and Fink, A. L. (2003). "Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones." Biochemistry **42**(28): 8465-71.

Gosavi, N., Lee, H. J., Lee, J. S., Patel, S. and Lee, S. J. (2002). "Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion." J Biol Chem **277**(50): 48984-92.

Greenamyre, J. T., Cannon, J. R., Drolet, R. and Mastroberardino, P. G. (2010). "Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease." Trends Pharmacol Sci **31**(4): 141-2; author reply 142-3.

Greenbaum, E. A., Graves, C. L., Mishizen-Eberz, A. J., Lupoli, M. A., Lynch, D. R., Englander, S. W., Axelsen, P. H. and Giasson, B. I. (2005). "The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation." J Biol Chem **280**(9): 7800-7.

Guo, J. P., Arai, T., Miklossy, J. and McGeer, P. L. (2006). "Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(6): 1953-8.

Haik, S., Privat, N., Adjou, K. T., Sazdovitch, V., Dormont, D., Duyckaerts, C. and Hauw, J. J. (2002). "Alpha-synuclein-immunoreactive deposits in human and animal prion diseases." Acta Neuropathol (Berl) **103**(5): 516-20.

Halliday, G., Herrero, M. T., Murphy, K., McCann, H., Ros-Bernal, F., Barcia, C., Mori, H., Blesa, F. J. and Obeso, J. A. (2009). "No Lewy pathology in monkeys with over 10 years of severe MPTP Parkinsonism." Mov Disord **24**(10): 1519-23.

Hansen, C., Angot, E., Bergstrom, A. L., Steiner, J. A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T. F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., Li, J. Y. and Brundin, P. (2011). "alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells." J Clin Invest.

Harris, D. A. (2003). "Trafficking, turnover and membrane topology of PrP." Br Med Bull **66**: 71-85.

Hasegawa, M., Fujiwara, H., Nonaka, T., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Mann, D. and Iwatsubo, T. (2002). "Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions." J Biol Chem **277**(50): 49071-6.

Hashimoto, M., Hsu, L. J., Rockenstein, E., Takenouchi, T., Mallory, M. and Masliah, E. (2002). "alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells." J Biol Chem **277**(13): 11465-72.

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

Hawkes, C. H., Del Tredici, K. and Braak, H. (2009). "Parkinson's disease: the dual hit theory revisited." Ann N Y Acad Sci **1170**: 615-22.

Head, M. W., Lowrie, S., Chohan, G., Knight, R., Scoones, D. J. and Ironside, J. W. (2010). "Variably protease-sensitive prionopathy in a PRNP codon 129 heterozygous UK patient with co-existing tau, alpha synuclein and Abeta pathology." Acta Neuropathol **120**(6): 821-3.

Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. and Lingappa, V. R. (1998). "A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease." Science **279**(5352): 827-34.

Hegde, R. S., Tremblay, P., Groth, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. and Lingappa, V. R. (1999). "Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration." Nature **402**(6763): 822-6.

Hetz, C., Maundrell, K. and Soto, C. (2003). "Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders?" Trends Mol Med **9**(6): 237-43.

Hoglinger, G. U., Feger, J., Prigent, A., Michel, P. P., Parain, K., Champy, P., Ruberg, M., Oertel, W. H. and Hirsch, E. C. (2003). "Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats." J Neurochem **84**(3): 491-502.

Holdorff, B. (2006). "Fritz Heinrich Lewy (1885-1950)." J Neurol **253**(5): 677-8.

Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N. and Shinagawa, M. (1995). "A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep." J Gen Virol **76 (Pt 10)**: 2583-7.

Hoyer, W., Cherny, D., Subramaniam, V. and Jovin, T. M. (2004). "Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109-140 on alpha-synuclein aggregation in vitro." Biochemistry **43**(51): 16233-42.

Hsu, L. J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M. and Masliah, E. (2000). "alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress." Am J Pathol **157**(2): 401-10.

Ironside, J. W. (2010). "Variant Creutzfeldt-Jakob disease." Haemophilia **16 Suppl 5**: 175-80.

Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H. A., Kittel, A. and Saitoh, T. (1995). "The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system." Neuron **14**(2): 467-75.

Jackson-Lewis, V. and Przedborski, S. (2007). "Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease." Nat Protoc **2**(1): 141-51.

Jakes, R., Spillantini, M. G. and Goedert, M. (1994). "Identification of two distinct synucleins from human brain." FEBS Lett **345**(1): 27-32.

Jao, C. C., Hegde, B. G., Chen, J., Haworth, I. S. and Langen, R. (2008). "Structure of membrane-bound alpha-synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(50): 19666-71.

Jarrett, J. T. and Lansbury, P. T., Jr. (1993). "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" Cell **73**(6): 1055-8.

Javitch, J. A. and Snyder, S. H. (1984). "Uptake of MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP." Eur J Pharmacol **106**(2): 455-6.

Jellinger, K. A. (2003). "Neuropathological spectrum of synucleinopathies." Mov Disord **18 Suppl 6**: S2-12.

Jellinger, K. A. (2010). "Interaction between alpha-synuclein and tau in Parkinson's disease Comment on Wills et al.: Elevated tauopathy and alpha-synuclein pathology in postmortem Parkinson's disease brains with and without dementia. Exp Neurol 2010; 225: 210-218." Exp Neurol.

Jenco, J. M., Rawlingson, A., Daniels, B. and Morris, A. J. (1998). "Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins." Biochemistry **37**(14): 4901-9.

Jeon, B. S., Jackson-Lewis, V. and Burke, R. E. (1995). "6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death." Neurodegeneration **4**(2): 131-7.

Jiang, H., Wu, Y. C., Nakamura, M., Liang, Y., Tanaka, Y., Holmes, S., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Ross, C. A. and Smith, W. W. (2007). "Parkinson's disease genetic mutations increase cell susceptibility to stress: mutant alpha-synuclein enhances H2O2- and Sin-1-induced cell death." Neurobiol Aging **28**(11): 1709-17.

Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Jacobsen, H., Schindzielorz, A., Okochi, M., Leimer, U., van Der Putten, H., Probst, A., Kremmer, E., Kretzschmar, H. A. and Haass, C. (2000). "Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain." J Neurosci **20**(17): 6365-73.

Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Odoy, S., Okamoto, N., Jacobsen, H., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., Takahashi, H., Wakabayashi, K., Bogdanovic, N., Riederer, P., Kretzschmar, H. A. and Haass, C. (2001). "Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model." Am J Pathol **159**(6): 2215-25.

Kasai, T., Tokuda, T., Yamaguchi, N., Watanabe, Y., Kametani, F., Nakagawa, M. and Mizuno, T. (2008). "Cleavage of normal and pathological forms of alpha-synuclein by neurosin in vitro." Neurosci Lett **436**(1): 52-6.

Kim, I. S., Ko, H. M., Koppula, S., Kim, B. W. and Choi, D. K. (2011). "Protective effect of Chrysanthemum indicum Linne against 1-methyl-4-phenylpridinium ion and lipopolysaccharide -induced cytotoxicity in cellular model of Parkinson's disease." Food Chem Toxicol.

Kim, S., Jeon, B. S., Heo, C., Im, P. S., Ahn, T. B., Seo, J. H., Kim, H. S., Park, C. H., Choi, S. H., Cho, S. H., Lee, W. J. and Suh, Y. H. (2004). "Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease." FASEB J **18**(13): 1615-7.

Kim, T. D., Paik, S. R., Yang, C. H. and Kim, J. (2000). "Structural changes in alpha-synuclein affect its chaperone-like activity in vitro." Protein Sci **9**(12): 2489-96.

Kim, Y. S., Laurine, E., Woods, W. and Lee, S. J. (2006). "A novel mechanism of interaction between alpha-synuclein and biological membranes." J Mol Biol **360**(2): 386-97.

Kirik, D., Annett, L. E., Burger, C., Muzyczka, N., Mandel, R. J. and Bjorklund, A. (2003). "Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2884-9.

Kirik, D., Rosenblad, C., Burger, C., Lundberg, C., Johansen, T. E., Muzyczka, N., Mandel, R. J. and Bjorklund, A. (2002). "Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system." J Neurosci **22**(7): 2780-91.

Kobayashi, A., Satoh, S., Ironside, J. W., Mohri, S. and Kitamoto, T. (2005). "Type 1 and type 2 human PrPSc have different aggregation sizes in methionine homozygotes with sporadic, iatrogenic and variant Creutzfeldt-Jakob disease." J Gen Virol **86**(Pt 1): 237-40.

Kontopoulos, E., Parvin, J. D. and Feany, M. B. (2006). "Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity." Hum Mol Genet **15**(20): 3012-23.

Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B. and Olanow, C. W. (2008a). "Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease." Nat Med **14**(5): 504-6.

Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Olanow, C. W. and Freeman, T. B. (2008b). "Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report." Mov Disord **23**(16): 2303-6.

Kordower, J. H., Kanaan, N. M., Chu, Y., Suresh Babu, R., Stansell, J., 3rd, Terpstra, B. T., Sortwell, C. E., Steece-Collier, K. and Collier, T. J. (2006). "Failure of proteasome inhibitor administration to provide a model of Parkinson's disease in rats and monkeys." Ann Neurol **60**(2): 264-8.

Kovacs, G. G., Botond, G. and Budka, H. (2010a). "Protein coding of neurodegenerative dementias: the neuropathological basis of biomarker diagnostics." Acta Neuropathol **119**(4): 389-408.

Kovacs, G. G., Seguin, J., Quadrio, I., Hoftberger, R., Kapas, I., Streichenberger, N., Biacabe, A. G., Meyronet, D., Sciot, R., Vandenberghe, R., Majtenyi, K., Laszlo, L., Strobel, T., Budka, H. and Perret-Liaudet, A. (2010b). "Genetic Creutzfeldt-Jakob disease associated with the E200K mutation: characterization of a complex proteinopathy." Acta Neuropathol.

Kovacs, G. G., Voigtlander, T., Hainfellner, J. A. and Budka, H. (2002). "Distribution of intraneuronal immunoreactivity for the prion protein in human prion diseases." Acta Neuropathol **104**(3): 320-6.

Kragh, C. L., Lund, L. B., Febbraro, F., Hansen, H. D., Gai, W. P., El-Agnaf, O., Richter-Landsberg, C. and Jensen, P. H. (2009). "{alpha}-Synuclein Aggregation and Ser-129 Phosphorylation-dependent Cell Death in Oligodendroglial Cells." J Biol Chem **284**(15): 10211-22.

Krammer, C., Schatzl, H. M. and Vorberg, I. (2009). "Prion-like propagation of cytosolic protein aggregates: insights from cell culture models." Prion **3**(4): 206-12.

Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schols, L. and Riess, O. (1998). "Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease." Nat Genet **18**(2): 106-8.

Kuczius, T. and Groschup, M. H. (1999). "Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains." Mol Med **5**(6): 406-18.

Kuwahara, T., Koyama, A., Gengyo-Ando, K., Masuda, M., Kowa, H., Tsunoda, M., Mitani, S. and Iwatsubo, T. (2006). "Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic Caenorhabditis elegans." J Biol Chem **281**(1): 334-40.

Larsen, K. E., Schmitz, Y., Troyer, M. D., Mosharov, E., Dietrich, P., Quazi, A. Z., Savalle, M., Nemani, V., Chaudhry, F. A., Edwards, R. H., Stefanis, L. and Sulzer, D. (2006). "Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis." J Neurosci **26**(46): 11915-22.

Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T. and Lansbury, P. T., Jr. (2002). "Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations." Nature **418**(6895): 291.

Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Hauw, J. J. and Dormont, D. (1996). "Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy." J Gen Virol **77 (Pt 7)**: 1601-9.

Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J. M., Fournier, J. G., Hauw, J. J., Rossier, J. and Dormont, D. (1997). "Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein." Science **275**(5298): 402-5.

Lavedan, C. (1998). "The Synuclein Family." Genome Res **8**: 871-880.

Lebouvier, T., Neunlist, M., Bruley des Varannes, S., Coron, E., Drouard, A., N'Guyen, J. M., Chaumette, T., Tasselli, M., Paillusson, S., Flamand, M., Galmiche, J. P., Damier, P. and

Derkinderen, P. (2010). "Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms." PLoS One **5**(9): e12728.

Lee, H. J., Choi, C. and Lee, S. J. (2002a). "Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form." J Biol Chem **277**(1): 671-8.

Lee, H. J., Patel, S. and Lee, S. J. (2005). "Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates." J Neurosci **25**(25): 6016-24.

Lee, H. J., Shin, S. Y., Choi, C., Lee, Y. H. and Lee, S. J. (2002b). "Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors." J Biol Chem **277**(7): 5411-7.

Lee, H. J., Suk, J. E., Bae, E. J., Lee, J. H., Paik, S. R. and Lee, S. J. (2008a). "Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein." Int J Biochem Cell Biol **40**(9): 1835-49.

Lee, H. J., Suk, J. E., Bae, E. J. and Lee, S. J. (2008b). "Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia." Biochem Biophys Res Commun **372**(3): 423-8.

Lee, H. J., Suk, J. E., Patrick, C., Bae, E. J., Cho, J. H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E. and Lee, S. J. (2010a). "Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies." J Biol Chem **285**(12): 9262-72.

Lee, M. K., Stirling, W., Xu, Y., Xu, X., Qui, D., Mandir, A. S., Dawson, T. M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Price, D. L. (2002c). "Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8968-73.

Lee, S. J., Desplats, P., Sigurdson, C., Tsigelny, I. and Masliah, E. (2010b). "Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates." Nat Rev Neurol **6**(12): 702-6.

Lewis, K. A., Su, Y., Jou, O., Ritchie, C., Foong, C., Hynan, L. S., White, C. L., 3rd, Thomas, P. J. and Hatanpaa, K. J. (2010). "Abnormal neurites containing C-terminally truncated alpha-synuclein are present in Alzheimer's disease without conventional Lewy body pathology." Am J Pathol **177**(6): 3037-50.

Lezmi, S., Bencsik, A. and Baron, T. (2006). "PET-blot analysis contributes to BSE strain recognition in C57Bl/6 mice." J Histochem Cytochem **54**(10): 1087-94.

Lezmi, S., Seuberlich, T., Oevermann, A., Baron, T. and Bencsik, A. (2011). "Comparison of Brain PrPd Distribution in Ovine BSE and Scrapie." Vet Pathol.

Li, J., Uversky, V. N. and Fink, A. L. (2001). "Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein." Biochemistry **40**(38): 11604-13.

Li, J. Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., Rehncrona, S., Bjorklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O. and Brundin, P. (2008). "Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation." Nat Med **14**(5): 501-3.

Li, J. Y., Englund, E., Widner, H., Rehncrona, S., Bjorklund, A., Lindvall, O. and Brundin, P. (2010). "Characterization of Lewy body pathology in 12- and 16-year-old intrastriatal mesencephalic grafts surviving in a patient with Parkinson's disease." Mov Disord **25**(8): 1091-6.

Li, W., Lesuisse, C., Xu, Y., Troncoso, J. C., Price, D. L. and Lee, M. K. (2004). "Stabilization of alpha-synuclein protein with aging and familial parkinson's disease-linked A53T mutation." J Neurosci **24**(33): 7400-9.

Li, W., West, N., Colla, E., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Marsh, L., Dawson, T. M., Jakala, P., Hartmann, T., Price, D. L. and Lee, M. K. (2005). "Aggregation promoting C-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(6): 2162-7.

Lindersson, E., Beedholm, R., Hojrup, P., Moos, T., Gai, W., Hendil, K. B. and Jensen, P. H. (2004). "Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers." J Biol Chem **279**(13): 12924-34.

Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehncrona, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K. L., Sawle, G., Rothwell, J. C., Marsden, C. D. and et al. (1990). "Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease." Science **247**(4942): 574-7.

Liu, C. W., Giasson, B. I., Lewis, K. A., Lee, V. M., Demartino, G. N. and Thomas, P. J. (2005). "A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation: implications for pathogenesis of Parkinson disease." J Biol Chem **280**(24): 22670-8.

Liu, G., Zhang, C., Yin, J., Li, X., Cheng, F., Li, Y., Yang, H., Ueda, K., Chan, P. and Yu, S. (2009). "alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity." Neurosci Lett **454**(3): 187-92.

Lloyd, S. E. and Collinge, J. (2005). "Genetic Susceptibility to Prion Diseases in Humans and Mice." Current Genomics **6**(1): 1-11.

Lopes, F. M., Schroder, R., da Frota, M. L., Jr., Zanotto-Filho, A., Muller, C. B., Pires, A. S., Meurer, R. T., Colpo, G. D., Gelain, D. P., Kapczinski, F., Moreira, J. C., Fernandes Mda, C. and Klamt, F. (2010). "Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies." Brain Res **1337**: 85-94.

Lou, H., Montoya, S. E., Alerte, T. N., Wang, J., Wu, J., Peng, X., Hong, C. S., Friedrich, E. E., Mader, S. A., Pedersen, C. J., Marcus, B. S., McCormack, A. L., Di Monte, D. A., Daubner, S. C. and Perez, R. G. (2010). "Serine 129 phosphorylation reduces the ability of alpha-synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A in vitro and in vivo." J Biol Chem **285**(23): 17648-61.

Luk, K. C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J. R., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2009). "Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(47): 20051-6.

Luthman, J., Fredriksson, A., Sundstrom, E., Jonsson, G. and Archer, T. (1989). "Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage." Behav Brain Res **33**(3): 267-77.

Lynch, S. M., Zhou, C. and Messer, A. (2008). "An scFv intrabody against the nonamyloid component of alpha-synuclein reduces intracellular aggregation and toxicity." J Mol Biol **377**(1): 136-47.

Machiya, Y., Hara, S., Arawaka, S., Fukushima, S., Sato, H., Sakamoto, M., Koyama, S. and Kato, T. (2010). "Phosphorylated {alpha}-synuclein at Ser129 is targeted to the proteasome pathway in a ubiquitin-independent manner." J Biol Chem.

Macinnes, N., Iravani, M. M., Perry, E., Piggott, M., Perry, R., Jenner, P. and Ballard, C. (2008). "Proteasomal abnormalities in cortical Lewy body disease and the impact of proteasomal inhibition within cortical and cholinergic systems." J Neural Transm.

Madine, J., Doig, A. J. and Middleton, D. A. (2006). "A study of the regional effects of alpha-synuclein on the organization and stability of phospholipid bilayers." Biochemistry **45**(18): 5783-92.

Maingay, M., Romero-Ramos, M. and Kirik, D. (2005). "Viral vector mediated overexpression of human alpha-synuclein in the nigrostriatal dopaminergic neurons: a new model for Parkinson's disease." CNS Spectr **10**(3): 235-44.

Mange, A., Beranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y. and Lehmann, S. (2004). "Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein." Biol Cell **96**(2): 125-32.

Manning-Bog, A. B., McCormack, A. L., Li, J., Uversky, V. N., Fink, A. L. and Di Monte, D. A. (2002). "The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein." J Biol Chem **277**(3): 1641-4.

Manning-Bog, A. B., Reaney, S. H., Chou, V. P., Johnston, L. C., McCormack, A. L., Johnston, J., Langston, J. W. and Di Monte, D. A. (2006). "Lack of nigrostriatal pathology in a rat model of proteasome inhibition." Ann Neurol **60**(2): 256-60.

Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H. and Hope, J. (1992). "The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?" Development **115**(1): 117-22.

Manson, J. C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I. and Hope, J. (1994). "129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal." Mol Neurobiol **8**(2-3): 121-7.

Manuelidis, L. (2004). "A virus behind the mask of prions?" Folia Neuropathol **42 Suppl B**: 10-23.

Maroteaux, L., Campanelli, J. T. and Scheller, R. H. (1988). "Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal." J Neurosci **8**(8): 2804-15.

Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A. C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D. C., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P. T., Sulzer, D. and Cuervo, A. M. (2008). "Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy." J Clin Invest **118**(2): 777-88.

Marttila, R. J., Kaprio, J., Koskenvuo, M. and Rinne, U. K. (1988). "Parkinson's disease in a nationwide twin cohort." Neurology **38**(8): 1217-9.

Marui, W., Iseki, E., Ueda, K. and Kosaka, K. (2000). "Occurrence of human alpha-synuclein immunoreactive neurons with neurofibrillary tangle formation in the limbic areas of patients with Alzheimer's disease." J Neurol Sci **174**(2): 81-4.

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

Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Sagara, Y., Mallory, M., Hashimoto, M. and Mucke, L. (2001). "beta-amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12245-50.

Matsuoka, Y., Vila, M., Lincoln, S., McCormack, A., Picciano, M., LaFrancois, J., Yu, X., Dickson, D., Langston, W. J., McGowan, E., Farrer, M., Hardy, J., Duff, K., Przedborski, S. and Di Monte, D. A. (2001). "Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter." Neurobiol Dis **8**(3): 535-9.

McKeith, I. G., Dickson, D. W., Lowe, J., Emre, M., O'Brien, J. T., Feldman, H., Cummings, J., Duda, J. E., Lippa, C., Perry, E. K., Aarsland, D., Arai, H., Ballard, C. G., Boeve, B., Burn, D. J., Costa, D., Del Ser, T., Dubois, B., Galasko, D., Gauthier, S., Goetz, C. G., Gomez-Tortosa, E., Halliday, G., Hansen, L. A., Hardy, J., Iwatsubo, T., Kalaria, R. N., Kaufer, D., Kenny, R. A., Korczyn, A., Kosaka, K., Lee, V. M., Lees, A., Litvan, I., Londos, E., Lopez, O. L., Minoshima, S., Mizuno, Y., Molina, J. A., Mukaetova-Ladinska, E. B., Pasquier, F., Perry, R. H., Schulz, J. B., Trojanowski, J. Q. and Yamada, M. (2005). "Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium." Neurology **65**(12): 1863-72.

McNaught, K. S., Perl, D. P., Brownell, A. L. and Olanow, C. W. (2004). "Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease." Ann Neurol **56**(1): 149-62.

Mendez, I., Vinuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., Tierney, T., Holness, R., Dagher, A., Trojanowski, J. Q. and Isacson, O. (2008). "Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years." Nat Med **14**(5): 507-9.

Messer, A., Lynch, S. M. and Butler, D. C. (2009). "Developing intrabodies for the therapeutic suppression of neurodegenerative pathology." Expert Opin Biol Ther **9**(9): 1189-97.

Meyer, A. K., Maisel, M., Hermann, A., Stirl, K. and Storch, A. (2010). "Restorative approaches in Parkinson's Disease: which cell type wins the race?" J Neurol Sci **289**(1-2): 93-103.

Meyne, F., Gloeckner, S. F., Ciesielczyk, B., Heinemann, U., Krasnianski, A., Meissner, B. and Zerr, I. (2009). "Total prion protein levels in the cerebrospinal fluid are reduced in patients with various neurological disorders." J Alzheimers Dis **17**(4): 863-73.

Miake, H., Mizusawa, H., Iwatsubo, T. and Hasegawa, M. (2002). "Biochemical characterization of the core structure of alpha-synuclein filaments." J Biol Chem **277**(21): 19213-9.

Miller, G. (2009). "Neurodegeneration. Could they all be prion diseases?" Science **326**(5958): 1337-9.

Mishizen-Eberz, A. J., Guttmann, R. P., Giasson, B. I., Day, G. A., 3rd, Hodara, R., Ischiropoulos, H., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. and Lynch, D. R. (2003). "Distinct cleavage patterns of normal and pathologic forms of alpha-synuclein by calpain I in vitro." J Neurochem **86**(4): 836-47.

Mollenhauer, B., El-Agnaf, O. M., Marcus, K., Trenkwalder, C. and Schlossmacher, M. G. (2010). "Quantification of alpha-synuclein in cerebrospinal fluid as a biomarker candidate: review of the literature and considerations for future studies." Biomark Med **4**(5): 683-99.

Morales, R., Estrada, L. D., Diaz-Espinoza, R., Morales-Scheihing, D., Jara, M. C., Castilla, J. and Soto, C. (2010). "Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases." J Neurosci **30**(13): 4528-35.

Mougenot, A. L., Betemps, D., Hogeveen, K. N., Kovacs, G. G., Chouaf-Lakhdar, L., Milhavet, O., Lehmann, S., Legastelois, S., Pin, J. J. and Baron, T. G. (2010). "Production of a monoclonal antibody, against human alpha-synuclein, in a subpopulation of C57BL/6J mice, presenting a deletion of the alpha-synuclein locus." J Neurosci Methods **192**(2): 268-76.

Moya, K. L., Sales, N., Hassig, R., Creminon, C., Grassi, J. and Di Giamberardino, L. (2000). "Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain." Microsc Res Tech **50**(1): 58-65.

Murray, I. V., Giasson, B. I., Quinn, S. M., Koppaka, V., Axelsen, P. H., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2003). "Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro." Biochemistry **42**(28): 8530-40.

Narhi, L., Wood, S. J., Steavenson, S., Jiang, Y., Wu, G. M., Anafi, D., Kaufman, S. A., Martin, F., Sitney, K., Denis, P., Louis, J. C., Wypych, J., Biere, A. L. and Citron, M. (1999). "Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation." J Biol Chem **274**(14): 9843-6.

Negro, A., Brunati, A. M., Donella-Deana, A., Massimino, M. L. and Pinna, L. A. (2002). "Multiple phosphorylation of alpha-synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation." FASEB J **16**(2): 210-2.

Nemani, V. M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M. K., Chaudhry, F. A., Nicoll, R. A. and Edwards, R. H. (2010). "Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis." Neuron **65**(1): 66-79.

Neumann, M., Muller, V., Kretzschmar, H. A., Haass, C. and Kahle, P. J. (2004). "Regional distribution of proteinase K-resistant alpha-synuclein correlates with Lewy body disease stage." J Neuropathol Exp Neurol **63**(12): 1225-35.

Nicholson, E. M., Brunelle, B. W., Richt, J. A., Kehrli, M. E., Jr. and Greenlee, J. J. (2008). "Identification of a heritable polymorphism in bovine PRNP associated with genetic transmissible spongiform encephalopathy: evidence of heritable BSE." PLoS One **3**(8): e2912.

Nicklas, W. J., Vyas, I. and Heikkila, R. E. (1985). "Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine." Life Sci **36**(26): 2503-8.

Nonaka, T., Watanabe, S. T., Iwatsubo, T. and Hasegawa, M. (2010). "Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases." J Biol Chem.

Norris, E. H., Giasson, B. I., Hodara, R., Xu, S., Trojanowski, J. Q., Ischiropoulos, H. and Lee, V. M. (2005). "Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations." J Biol Chem **280**(22): 21212-9.

Norris, E. H., Giasson, B. I. and Lee, V. M. (2004). "Alpha-synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases." Curr Top Dev Biol **60**: 17-54.

Norris, E. H., Uryu, K., Leight, S., Giasson, B. I., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2007). "Pesticide exposure exacerbates alpha-synucleinopathy in an A53T transgenic mouse model." Am J Pathol **170**(2): 658-66.

Nussbaum, R. L. and Polymeropoulos, M. H. (1997). "Genetics of Parkinson's disease." Hum Mol Genet **6**(10): 1687-91.

Olanow, C. W. and Kordower, J. H. (2009a). "Modeling Parkinson's disease." Ann Neurol **66**(4): 432-6.

Olanow, C. W., Kordower, J. H., Lang, A. E. and Obeso, J. A. (2009b). "Dopaminergic transplantation for Parkinson's disease: current status and future prospects." Ann Neurol **66**(5): 591-6.

Olanow, C. W., Perl, D. P., DeMartino, G. N. and McNaught, K. S. (2004). "Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis." Lancet Neurol **3**(8): 496-503.

Olanow, C. W. and Prusiner, S. B. (2009c). "Is Parkinson's disease a prion disorder?" Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12571-2.

Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J. and Wolozin, B. (1999). "alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins." J Neurosci **19**(14): 5782-91.

Outeiro, T. F. and Lindquist, S. (2003). "Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology." Science **302**(5651): 1772-5.

Owen, J. P., Rees, H. C., Maddison, B. C., Terry, L. A., Thorne, L., Jackman, R., Whitelam, G. C. and Gough, K. C. (2007). "Molecular profiling of ovine prion diseases by using thermolysin-resistant PrPSc and endogenous C2 PrP fragments." J Virol **81**(19): 10532-9.

Paleologou, K. E., Oueslati, A., Shakked, G., Rospigliosi, C. C., Kim, H. Y., Lamberto, G. R., Fernandez, C. O., Schmid, A., Chegini, F., Gai, W. P., Chiappe, D., Moniatte, M., Schneider, B. L., Aebischer, P., Eliezer, D., Zweckstetter, M., Masliah, E. and Lashuel, H. A. (2010). "Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions." J Neurosci **30**(9): 3184-98.

Paleologou, K. E., Schmid, A. W., Rospigliosi, C. C., Kim, H. Y., Lamberto, G. R., Fredenburg, R. A., Lansbury, P. T., Jr., Fernandez, C. O., Eliezer, D., Zweckstetter, M. and Lashuel, H. A. (2008). "Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimics S129E/D inhibits the fibrillation of alpha-synuclein." J Biol Chem **283**(24): 16895-905.

Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., Knels, L., Pursche, S., Jung, R., Jackson, S., Gille, G., Spillantini, M. G., Reichmann, H. and Funk, R. H. (2010). "Progression of Parkinson's disease

pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice." PLoS One **5**(1): e8762.

Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. and et al. (1993). "Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 10962-6.

Parizek, P., Roeckl, C., Weber, J., Flechsig, E., Aguzzi, A. and Raeber, A. J. (2001). "Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells." J Biol Chem **276**(48): 44627-32.

Parker, W. D., Jr. and Swerdlow, R. H. (1998). "Mitochondrial dysfunction in idiopathic Parkinson disease." Am J Hum Genet **62**(4): 758-62.

Parkinson, J. (2002). "An essay on the shaking palsy. 1817." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **14**(2): 223-36; discussion 222.

Payton, J. E., Perrin, R. J., Woods, W. S. and George, J. M. (2004). "Structural determinants of PLD2 inhibition by alpha-synuclein." J Mol Biol **337**(4): 1001-9.

Perese, D. A., Ulman, J., Viola, J., Ewing, S. E. and Bankiewicz, K. S. (1989). "A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model." Brain Res **494**(2): 285-93.

Perez, R. G., Waymire, J. C., Lin, E., Liu, J. J., Guo, F. and Zigmond, M. J. (2002). "A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis." J Neurosci **22**(8): 3090-9.

Pesah, Y., Burgess, H., Middlebrooks, B., Ronningen, K., Prosser, J., Tirunagaru, V., Zysk, J. and Mardon, G. (2005). "Whole-mount analysis reveals normal numbers of dopaminergic neurons following misexpression of alpha-Synuclein in Drosophila." Genesis **41**(4): 154-9.

Petrucelli, L., O'Farrell, C., Lockhart, P. J., Baptista, M., Kehoe, K., Vink, L., Choi, P., Wolozin, B., Farrer, M., Hardy, J. and Cookson, M. R. (2002). "Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons." Neuron **36**(6): 1007-19.

Piccardo, P., Manson, J. C., King, D., Ghetti, B. and Barron, R. M. (2007). "Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(11): 4712-7.

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I. and Nussbaum, R. L. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science **276**(5321): 2045-7.

Pountney, D. L., Voelcker, N. H. and Gai, W. P. (2005). "Annular alpha-synuclein oligomers are potentially toxic agents in alpha-synucleinopathy. Hypothesis." Neurotox Res **7**(1-2): 59-67.

Prasad, J. E., Kumar, B., Andreatta, C., Nahreini, P., Hanson, A. J., Yan, X. D. and Prasad, K. N. (2004). "Overexpression of alpha-synuclein decreased viability and enhanced sensitivity to

prostaglandin E(2), hydrogen peroxide, and a nitric oxide donor in differentiated neuroblastoma cells." J Neurosci Res **76**(3): 415-22.

Pronin, A. N., Morris, A. J., Surguchov, A. and Benovic, J. L. (2000). "Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases." J Biol Chem **275**(34): 26515-22.

Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science **216**(4542): 136-44.

Prusiner, S. B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S. L. and DeArmond, S. J. (1993). "Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10608-12.

Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Jakowec, M., Petzinger, G., Miller, R. and Akram, M. (2001). "The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety." J Neurochem **76**(5): 1265-74.

Quilty, M. C., King, A. E., Gai, W. P., Pountney, D. L., West, A. K., Vickers, J. C. and Dickson, T. C. (2006). "Alpha-synuclein is upregulated in neurones in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection." Exp Neurol **199**(2): 249-56.

Raeber, A. J., Brandner, S., Klein, M. A., Benninger, Y., Musahl, C., Frigg, R., Roeckl, C., Fischer, M. B., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1998). "Transgenic and knockout mice in research on prion diseases." Brain Pathol **8**(4): 715-33.

Raghavan, R., Kruijff, L., Sterrenburg, M. D., Rogers, B. B., Hladik, C. L. and White, C. L., 3rd (2004). "Alpha-synuclein expression in the developing human brain." Pediatr Dev Pathol **7**(5): 506-16.

Rappley, I., Gitler, A. D., Selvy, P. E., LaVoie, M. J., Levy, B. D., Brown, H. A., Lindquist, S. and Selkoe, D. J. (2009). "Evidence that alpha-synuclein does not inhibit phospholipase D." Biochemistry **48**(5): 1077-83.

Rathke-Hartlieb, S., Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Haid, S., Okochi, M., Haass, C. and Schulz, J. B. (2001). "Sensitivity to MPTP is not increased in Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein transgenic mice." J Neurochem **77**(4): 1181-4.

Richfield, E. K., Thiruchelvam, M. J., Cory-Slechta, D. A., Wuertzer, C., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., Di Monte, D. A. and Federoff, H. J. (2002). "Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice." Exp Neurol **175**(1): 35-48.

Richter, F., Hamann, M. and Richter, A. (2007). "Chronic rotenone treatment induces behavioral effects but no pathological signs of parkinsonism in mice." J Neurosci Res **85**(3): 681-91.

Rideout, H. J., Larsen, K. E., Sulzer, D. and Stefanis, L. (2001). "Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells." J Neurochem **78**(4): 899-908.

Riesner, D. (2003). "Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc)." Br Med Bull **66**: 21-33.

Ritchie, D. L., Boyle, A., McConnell, I., Head, M. W., Ironside, J. W. and Bruce, M. E. (2009). "Transmissions of variant Creutzfeldt-Jakob disease from brain and lymphoreticular tissue

show uniform and conserved bovine spongiform encephalopathy-related phenotypic properties on primary and secondary passage in wild-type mice." J Gen Virol **90**(Pt 12): 3075-82.

Rockenstein, E., Mallory, M., Hashimoto, M., Song, D., Shults, C. W., Lang, I. and Masliah, E. (2002). "Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters." J Neurosci Res **68**(5): 568-78.

Rojas, P., Serrano-Garcia, N., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P. D. and Ruiz-Sanchez, E. (2010). "S-Allylcysteine, a garlic compound, protects against oxidative stress in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced parkinsonism in mice." J Nutr Biochem.

Saha, A. R., Ninkina, N. N., Hanger, D. P., Anderton, B. H., Davies, A. M. and Buchman, V. L. (2000). "Induction of neuronal death by alpha-synuclein." Eur J Neurosci **12**(8): 3073-7.

Schmidt, M. L., Martin, J. A., Lee, V. M. and Trojanowski, J. Q. (1996). "Convergence of Lewy bodies and neurofibrillary tangles in amygdala neurons of Alzheimer's disease and Lewy body disorders." Acta Neuropathol **91**(5): 475-81.

Schneider, B., Zufferey, R. and Aebischer, P. (2008). "Viral vectors, animal models and new therapies for Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **14 Suppl 2**: S169-71.

Schober, A. (2004). "Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP." Cell Tissue Res **318**(1): 215-24.

Schumacher, J. M., Ellias, S. A., Palmer, E. P., Kott, H. S., Dinsmore, J., Dempsey, P. K., Fischman, A. J., Thomas, C., Feldman, R. G., Kassissieh, S., Raineri, R., Manhart, C., Penney, D., Fink, J. S. and Isacson, O. (2000). "Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD." Neurology **54**(5): 1042-50.

Scott, D. A., Tabarean, I., Tang, Y., Cartier, A., Masliah, E. and Roy, S. (2010). "A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration." J Neurosci **30**(24): 8083-95.

Sharon, R., Goldberg, M. S., Bar-Josef, I., Betensky, R. A., Shen, J. and Selkoe, D. J. (2001). "alpha-Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9110-5.

Sherer, T. B., Betarbet, R. and Greenamyre, J. T. (2005). Rotenone Rat and other Neurotoxin Models of Parkinson's Disease. Animal Models of Movement Disorders. A. P. Elsevier, LeDoux, M.**:** 161-172.

Sherer, T. B., Betarbet, R., Stout, A. K., Lund, S., Baptista, M., Panov, A. V., Cookson, M. R. and Greenamyre, J. T. (2002). "An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage." J Neurosci **22**(16): 7006-15.

Sherer, T. B., Kim, J. H., Betarbet, R. and Greenamyre, J. T. (2003). "Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation." Exp Neurol **179**(1): 9-16.

Shults, C. W. (2006). "Lewy bodies." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(6): 1661-8.

Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Muenter, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J. and Gwinn-Hardy, K. (2003). "alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease." Science **302**(5646): 841.

Siso, S., Puig, B., Varea, R., Vidal, E., Acin, C., Prinz, M., Montrasio, F., Badiola, J., Aguzzi, A., Pumarola, M. and Ferrer, I. (2002). "Abnormal synaptic protein expression and cell death in murine scrapie." Acta Neuropathol (Berl) **103**(6): 615-26.

Smith, W. W., Margolis, R. L., Li, X., Troncoso, J. C., Lee, M. K., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Iwatsubo, T. and Ross, C. A. (2005). "Alpha-synuclein phosphorylation enhances eosinophilic cytoplasmic inclusion formation in SH-SY5Y cells." J Neurosci **25**(23): 5544-52.

Snyder, H., Mensah, K., Theisler, C., Lee, J., Matouschek, A. and Wolozin, B. (2003). "Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function." J Biol Chem **278**(14): 11753-9.

Soper, J. H., Roy, S., Stieber, A., Lee, E., Wilson, R. B., Trojanowski, J. Q., Burd, C. G. and Lee, V. M. (2008). "Alpha-synuclein-induced aggregation of cytoplasmic vesicles in Saccharomyces cerevisiae." Mol Biol Cell **19**(3): 1093-103.

Sotiriou, E., Vassilatis, D. K., Vila, M. and Stefanis, L. (2009). "Selective noradrenergic vulnerability in alpha-synuclein transgenic mice." Neurobiol Aging.

Soto, C. and Estrada, L. D. (2008). "Protein misfolding and neurodegeneration." Arch Neurol **65**(2): 184-9.

Souza, J. M., Giasson, B. I., Chen, Q., Lee, V. M. and Ischiropoulos, H. (2000a). "Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies." J Biol Chem **275**(24): 18344-9.

Souza, J. M., Giasson, B. I., Lee, V. M. and Ischiropoulos, H. (2000b). "Chaperone-like activity of synucleins." FEBS Lett **474**(1): 116-9.

Sparkes, R. S., Simon, M., Cohn, V. H., Fournier, R. E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T. and et al. (1986). "Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(19): 7358-62.

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

Specht, C. G. and Schoepfer, R. (2004). "Deletion of multimerin-1 in alpha-synuclein-deficient mice." Genomics **83**(6): 1176-8.

Specht, C. G., Tigaret, C. M., Rast, G. F., Thalhammer, A., Rudhard, Y. and Schoepfer, R. (2005). "Subcellular localisation of recombinant alpha- and gamma-synuclein." Mol Cell Neurosci **28**(2): 326-34.

Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Cairns, N. J., Lantos, P. L. and Goedert, M. (1998). "Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." Neurosci Lett **251**(3): 205-8.

Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R. and Goedert, M. (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." Nature **388**(6645): 839-40.

Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. and Prusiner, S. B. (1987). "Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid." Cell **51**(2): 229-40.

Stewart, R. S., Drisaldi, B. and Harris, D. A. (2001). "A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum." Mol Biol Cell **12**(4): 881-9.

Sulzer, D. (2010). "Clues to how alpha-synuclein damages neurons in Parkinson's disease." Mov Disord **25 Suppl 1**: S27-31.

Tanaka, M., Collins, S. R., Toyama, B. H. and Weissman, J. S. (2006). "The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes." Nature **442**(7102): 585-9.

Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R. K., Wanner, T., Tanzi, R. E., Sawa, A., V, L. D., Dawson, T. M. and Ross, C. A. (2001). "Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis." Hum Mol Genet **10**(9): 919-26.

Tanner, C. M. (2003). "Is the cause of Parkinson's disease environmental or hereditary? Evidence from twin studies." Adv Neurol **91**: 133-42.

Testa, C. M., Sherer, T. B. and Greenamyre, J. T. (2005). "Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures." Brain Res Mol Brain Res **134**(1): 109-18.

Thayanidhi, N., Helm, J. R., Nycz, D. C., Bentley, M., Liang, Y. and Hay, J. C. (2010). "Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs." Mol Biol Cell **21**(11): 1850-63.

Theodore, S., Cao, S., McLean, P. J. and Standaert, D. G. (2008). "Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease." J Neuropathol Exp Neurol **67**(12): 1149-58.

Thiruchelvam, M., Richfield, E. K., Goodman, B. M., Baggs, R. B. and Cory-Slechta, D. A. (2002). "Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype." Neurotoxicology **23**(4-5): 621-33.

Tixador, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Chapuis, J., Le Dur, A., Laude, H. and Beringue, V. (2010). "The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent." PLoS Pathog **6**(4): e1000859.

Tofaris, G. K., Garcia Reitbock, P., Humby, T., Lambourne, S. L., O'Connell, M., Ghetti, B., Gossage, H., Emson, P. C., Wilkinson, L. S., Goedert, M. and Spillantini, M. G. (2006). "Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for

truncated human alpha-synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders." J Neurosci **26**(15): 3942-50.

Tofaris, G. K. and Spillantini, M. G. (2007). "Physiological and pathological properties of alpha-synuclein." Cell Mol Life Sci **64**(17): 2194-201.

Touchman, J. W., Dehejia, A., Chiba-Falek, O., Cabin, D. E., Schwartz, J. R., Orrison, B. M., Polymeropoulos, M. H. and Nussbaum, R. L. (2001). "Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element." Genome Res **11**(1): 78-86.

Tsigelny, I. F., Crews, L., Desplats, P., Shaked, G. M., Sharikov, Y., Mizuno, H., Spencer, B., Rockenstein, E., Trejo, M., Platoshyn, O., Yuan, J. X. and Masliah, E. (2008). "Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases." PLoS One **3**(9): e3135.

Tu, P. H., Galvin, J. E., Baba, M., Giasson, B., Tomita, T., Leight, S., Nakajo, S., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (1998). "Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein." Ann Neurol **44**(3): 415-22.

Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E. and Prusiner, S. B. (1988). "Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins." Eur J Biochem **176**(1): 21-30.

Ungerstedt, U. (1968). "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." Eur J Pharmacol **5**(1): 107-10.

Uversky, V. N. (2004). "Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration." Cell Tissue Res **318**(1): 225-41.

Uversky, V. N. (2007). "Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation." J Neurochem **103**(1): 17-37.

Uversky, V. N. and Fink, A. L. (2002a). "Amino acid determinants of alpha-synuclein aggregation: putting together pieces of the puzzle." FEBS Lett **522**(1-3): 9-13.

Uversky, V. N., Li, J. and Fink, A. L. (2001a). "Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation." J Biol Chem **276**(14): 10737-44.

Uversky, V. N., Li, J. and Fink, A. L. (2001b). "Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure." J Biol Chem **276**(47): 44284-96.

Uversky, V. N., Li, J. and Fink, A. L. (2001c). "Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease." FEBS Lett **500**(3): 105-8.

Uversky, V. N., Yamin, G., Souillac, P. O., Goers, J., Glaser, C. B. and Fink, A. L. (2002b). "Methionine oxidation inhibits fibrillation of human alpha-synuclein in vitro." FEBS Lett **517**(1-3): 239-44.

van der Putten, H., Wiederhold, K. H., Probst, A., Barbieri, S., Mistl, C., Danner, S., Kauffmann, S., Hofele, K., Spooren, W. P., Ruegg, M. A., Lin, S., Caroni, P., Sommer, B., Tolnay, M. and Bilbe,

G. (2000). "Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein." J Neurosci **20**(16): 6021-9.

Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M. F., Vilotte, J. L., Lehmann, S. and Laude, H. (2001). "Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4055-9.

Vital, A., Canron, M. H., Gil, R., Hauw, J. J. and Vital, C. (2007). "A sporadic case of Creutzfeldt-Jakob disease with beta-amyloid deposits and alpha-synuclein inclusions." Neuropathology **27**(3): 273-7.

Vivacqua, G., Casini, A., Vaccaro, R., Fornai, F., Yu, S. and D'Este, L. (2010). "Different sub-cellular localization of alpha-synuclein in the C57BL\6J mouse's central nervous system by two novel monoclonal antibodies." J Chem Neuroanat.

Volles, M. J. and Lansbury, P. T., Jr. (2003). "Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease." Biochemistry **42**(26): 7871-8.

Wadsworth, J. D., Joiner, S., Hill, A. F., Campbell, T. A., Desbruslais, M., Luthert, P. J. and Collinge, J. (2001). "Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay." Lancet **358**(9277): 171-80.

Wakabayashi, K., Yoshimoto, M., Tsuji, S. and Takahashi, H. (1998). "Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy." Neurosci Lett **249**(2-3): 180-2.

Waxman, E. A. and Giasson, B. I. (2009a). "Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration." Biochim Biophys Acta **1792**(7): 616-24.

Waxman, E. A., Mazzulli, J. R. and Giasson, B. I. (2009b). "Characterization of hydrophobic residue requirements for alpha-synuclein fibrillization." Biochemistry **48**(40): 9427-36.

Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A. and Lansbury, P. T., Jr. (1996). "NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded." Biochemistry **35**(43): 13709-15.

Weissmann, C. (1991). "A 'unified theory' of prion propagation." Nature **352**(6337): 679-83.

Weissmann, C. (1995). "Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies." Prog Brain Res **105**: 15-22.

Wersinger, C. and Sidhu, A. (2003). "Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein." Neurosci Lett **340**(3): 189-92.

Westaway, D. and Prusiner, S. B. (1986). "Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein." Nucleic Acids Res **14**(5): 2035-44.

Williamson, R. A., Peretz, D., Smorodinsky, N., Bastidas, R., Serban, H., Mehlhorn, I., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. and Burton, D. R. (1996). "Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 7279-82.

Withers, G. S., George, J. M., Banker, G. A. and Clayton, D. F. (1997). "Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons." Brain Res Dev Brain Res **99**(1): 87-94.

Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J. C., Citron, M. and Biere, A. L. (1999). "alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease." J Biol Chem **274**(28): 19509-12.

Xu, J., Kao, S. Y., Lee, F. J., Song, W., Jin, L. W. and Yankner, B. A. (2002). "Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease." Nat Med **8**(6): 600-6.

Yagi, H., Kusaka, E., Hongo, K., Mizobata, T. and Kawata, Y. (2005). "Amyloid fibril formation of alpha-synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins: implications for the mechanism of transmissible conformational diseases." J Biol Chem **280**(46): 38609-16.

Yu, S., Li, X., Liu, G., Han, J., Zhang, C., Li, Y., Xu, S., Liu, C., Gao, Y., Yang, H., Ueda, K. and Chan, P. (2007). "Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody." Neuroscience **145**(2): 539-55.

Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Munoz, D. G. and de Yebenes, J. G. (2004). "The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia." Ann Neurol **55**(2): 164-73.

Zhang, N. Y., Tang, Z. and Liu, C. W. (2008). "alpha-Synuclein protofibrils inhibit 26 S proteasome-mediated protein degradation: understanding the cytotoxicity of protein protofibrils in neurodegenerative disease pathogenesis." J Biol Chem **283**(29): 20288-98.

Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., Wilson, B., Zhou, Y., Hong, J. S. and Zhang, J. (2005). "Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease." FASEB J **19**(6): 533-42.

Zhou, C., Emadi, S., Sierks, M. R. and Messer, A. (2004). "A human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein." Mol Ther **10**(6): 1023-31.

RESUME

Les similitudes entre les mécanismes neurotoxiques responsables des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) et des synucléinoapthies, ainsi que la présence concomitante des formes pathologiques de la protéine prion et de l'α-synucléine au sein d'une même maladie neurodégénérative sont deux observations qui nous ont conduits à étudier les relations existant potentiellement entre les altérations moléculaires de l'α-synucléine et les maladies à prion.

Après avoir développé des anticorps monoclonaux en immunisant avec de l'α-synucléine recombinante humaine des souris n'exprimant pas de façon endogène cet immunogène, nous avons caractérisé les altérations moléculaires de l'α-synucléine apparaissant conjointement à une symptomatologie motrice sévère lors du vieillissement de souris transgéniques (TgM83) surexprimant l'α-synucléine humaine mutée en A53T.

Les essais d'inoculation intracérébrale de souris TgM83 par différentes souches de prion ont mis en évidence que la transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine de type H permet de déclencher chez ces animaux une maladie à prion de façon concomitante au développement d'altérations moléculaires de l'α-synucléine.

Enfin, l'importante accélération de la pathologie liée à l'α-synucléine observée chez des souris TgM83 ayant été inoculées par des tissus contenant des formes altérées de l'α-synucléine, constitue un résultat soutenant le fait que la pathologie liée à l'α-synucléine serait capable de se propager expérimentalement de proche en proche, comme la protéine prion pathologique au cours des EST.

TITLE

Alpha-synuclein molecular pathology : Potential relationship with prion diseases

ABSTRACT

The overlap of neurotoxic mecanisms involved in prion diseases and synucleinopathies, and the concommitant detection of pathological forms of prion and α-synuclein in a same neurodegenerative disease, raise questions about the existence of potential relationship between α-synuclein molecular alteration and prion diseases.

First, we developed monoclonal antibodies by immunizing mice presenting a spontaneous deletion of the α-synuclein gene with human recombinant α-synuclein. Then, we characterized the molecular alterations appearing jointly to clinical signs during the aging of a transgenic mouse model of synucleinopathies (TgM83), overexpressing human A53T α-synuclein.

Then, an approach routinely done in the field of prion was used to trigger a synucleinopathy alongside a prion disease. For this purpose, TgM83 mice were inoculated intracerebrally by three different prion strains : transmission of H-type bovine spongiform encephalopathy allows the onset of a prion disease concomitantly to the α-synuclein pathology developed by the TgM83 mouse model.

Finally, intracerebral inoculation of TgM83 mice with brain homogenates from symptomatic mice affected by a synucleinopathy triggers an important acceleration of the α-synuclein pathology, resulting in the early onset of motor clinical signs associated with molecular alterations of α-synuclein. These data suggest that α-synuclein alterations can be experimentally transmitted from one mouse to another, supporting the idea that, far from being confined to the transmissible spongiform encephalopathies, the « prion-like » propagation of misfolded neuronal proteins might occur in synucleinopathies.

DISCIPLINE

Science - Biologie

MOTS-CLES

α-synucléine, Prion, Maladie neurodégénérative, Parkinson, Synucléinopathie, ESST, Modèle murin, ESB classique, ESB de type H, Tremblante

KEYWORDS

α-synuclein, Prion, Neurodegenerative disease, Parkinson, Synucleinopathy, TSE, Mouse Model, C-BSE, H-BSE, Scrapie

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE

Anses – Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, 31 avenue Tony Garnier 69364 LYON cedex 07