



HAL
open science

Multifactorial and translational approaches for modeling synucleinopathies : mechanistic and therapeutic implications

Marie-Laure Arotcarena

► To cite this version:

Marie-Laure Arotcarena. Multifactorial and translational approaches for modeling synucleinopathies : mechanistic and therapeutic implications. *Neurons and Cognition [q-bio.NC]*. Université de Bordeaux, 2019. English. NNT : 2019BORD0164 . tel-02363002

HAL Id: tel-02363002

<https://theses.hal.science/tel-02363002>

Submitted on 14 Nov 2019

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ : NEUROSCIENCES

Par Marie-Laure AROTCARENA

**APPROCHES MULTIFACTORIELLES ET TRANSLATIONNELLES DANS
LA MODELISATION DES SYNUCLEINOPATHIES : IMPLICATIONS
MECANISTIQUES ET THERAPEUTIQUES**

Sous la direction du Dr. Benjamin DEHAY

Soutenue le 30 Septembre 2019

Membres du jury :

Dr. Nadine CAMOUGRAND
Dr. Olga CORTI
Dr. Philippe HANTRAYE
Dr. Benjamin DEHAY

Directeur de Recherche, CNRS
Directeur de Recherche, INSERM
Directeur de Recherche, CNRS
Chargé de recherche, INSERM

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ : NEUROSCIENCES

Par Marie-Laure AROTCARENA

**APPROCHES MULTIFACTORIELLES ET TRANSLATIONNELLES DANS
LA MODELISATION DES SYNUCLEINOPATHIES : IMPLICATIONS
MECANISTIQUES ET THERAPEUTIQUES**

Sous la direction du Dr. Benjamin DEHAY

Soutenue le 30 Septembre 2019

Membres du jury :

Dr. Nadine CAMOUGRAND
Dr. Olga CORTI
Dr. Philippe HANTRAYE
Dr. Benjamin DEHAY

Directeur de Recherche, CNRS
Directeur de Recherche, INSERM
Directeur de Recherche, CNRS
Chargé de recherche, INSERM

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

“If you can’t explain it simply, you don’t understand it well enough”

Albert Einstein

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Nadine Camougrand d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et je lui suis reconnaissante de l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider cette thèse. Mes remerciements sont aussi adressés au Dr Olga Corti et au Dr Philippe Hantraye pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier le Ministère Supérieur de l'Enseignement et de la Recherche pour le soutien financier au cours de ces trois années, ainsi que l'association France Parkinson pour l'année à venir.

Je tiens ensuite à adresser mes plus sincères remerciements au Dr Erwan Bézard pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son équipe dès mon stage de fin d'étude, et accepté que j'y poursuive mon aventure avec cette thèse. Merci pour votre confiance, votre disponibilité, votre bienveillance et votre accompagnement au cours de ces quelques années dans votre équipe.

Je souhaite, de manière plus importante, remercier mon directeur de thèse, le Dr. Benjamin Dehay avec qui je collaborais au quotidien. Ben, je pense sincèrement qu'on ne peut rêver meilleur encadrant dans l'apprentissage du travail de la recherche que toi et j'espère qu'en tant que première thésarde officielle sous ta supervision, j'ai su être à la hauteur. Merci pour ta patience, ta bienveillance et ton écoute à toute épreuve au cours de toutes ces années. Je reste admirative de ton parcours dans la recherche et tu as su me transmettre les valeurs de rigueur, de persévérance et de motivation qui sont les clefs de la réussite dans ce métier. Outre le soutien professionnel sans faille dont tu as fait preuve, la confiance humaine était toujours présente, et c'est peut-être ici la véritable clef d'une collaboration qui porte ces fruits. Merci pour la confiance que tu as placée en moi pendant ces trois années d'enrichissement scientifique, professionnel et personnel. Je te tiens évidemment au courant si je vois Vincent Cassel et sa famille sur la plage de Biarritz, maintenant que je connais ton amour pour les gossip !

-

Un travail de thèse ne peut être mené sans être entourée de personnes qui vous accompagnent et vous encouragent au quotidien dans le laboratoire.

Merci donc à Marie-Laure, Madame Thiolat, Maman Labo. Je ne saurais vraiment comment te remercier de tout cet amour au quotidien au sein du laboratoire, même si on sait tous que tu n'es

capable de le montrer qu'en râlant à longueur de journée. Je crois donc que tu m'aimes plutôt beaucoup... Merci d'avoir pris soin de moi pendant toutes ces années, pour ton écoute au quotidien et ta protection presque maternelle contre vents et marées. Un même prénom, une même origine piquante basque et un même sale caractère de cochon, on savait bien là qu'on tenait le cocktail d'une relation fusionnelle, précieuse et sans faille. Ne t'inquiète surtout pas, je viendrai régulièrement pour boire l'apéro au bord de ta piscine et papoter des heures, d'autant que l'invitation tient toujours !

Merci à Evelyne, ma deuxième maman. Merci pour ton écoute et ton soutien au cours de ces trois années. Même si devoir te répéter les mêmes choses à longueur de temps, comme si tu n'étais jamais dans le même monde que nous, était usant pendant ces trois années, c'est aussi cette légèreté et ces crises de rire qui ont rendu le quotidien au laboratoire si agréable. Merci aussi pour ces heures de discussions précieuses à tout moment, qui font du bien à la tête et au cœur, même quand on est en train de jouer les terminators à la chaîne. Je sais que tu aimes partager avec « les jeunes » comme tu dis, et je te remercie de tout ce que tu m'as transmis. J'espère t'avoir apporté moi aussi l'énergie dont tu avais besoin dans les périodes de baisse de régime. Encore quelques années de transmission aux jeunes devant toi et je suis certaine qu'ils vont adorer échanger avec toi, tout comme cela a été le cas pour moi !

Merci aussi à Alain, ta bienveillance si précieuse, tes conseils si sages que beaucoup devraient se mettre à écouter et tes attentions si gourmandes notamment à Pâques. Bientôt la retraite et les journées sur la côte les pieds dans l'eau à l'infini !

Merci à Christophe (mon Cricri), Sonia (ma bichette), Eric (ah bonjour Eric !), la team animation de ce labo. J'ai aussi partagé avec vous de fabuleux moments, souvent de franches rigolades ou de confidences qui permettent de décompresser à longueur de temps. Merci pour cette énergie positive tout au long de ces années. Une pensée également pour Chantal, qui m'a accueilli si chaleureusement au début de ces trois années.

Maintenant qu'on en a fini avec la tournée des plus vieux, passons à la jeunesse de cet institut !

Emilie, il est évident que j'allais commencer par toi. Ces derniers mois en ton absence m'ont paru si longs, sans mon repère et pilier n°1 de cette équipe. Cette rencontre ne s'est faite qu'au milieu

de ces trois années, mais quelle chance j'ai eu de t'avoir près de moi ! Je n'ai pas besoin de tout dire, tu sais comme moi qu'on partageait tout ici et même en dehors, que tu as été mon premier soutien et ma plus forte amitié ici alors merci pour tout. J'ai des souvenirs pleins la tête de notre aventure sur les terres californiennes qui resteront pour toujours, et HOP là, on y repart ?! Tu seras une maman magnifique, je n'en doute pas une seconde, et j'espère être à tes côtés longtemps pour te voir évoluer brillamment avec Alba.

Paulo, forcément le deuxième, milesker anitz ! J'ai dû te supporter deux années sur trois en compagnon de bureau, et tout le monde sait que c'était bien plus difficile pour toi que pour moi : entre mon amour pour le chant à voix haute et ma capacité à souffler un maximum de fois en un minimum de temps, tu as fait preuve d'une grande patience ! Merci pour tes conseils à chaque instant, ta bienveillance, ton soutien et ta bonne humeur au quotidien. Cette dernière année sans toi à mes côtés au bureau a été vraiment différente, merci tout simplement pour ton amitié. Continuons à nous retrouver autour de pintes, ici ou dans notre pays cher à notre cœur !

Et puis il y a des rencontres importunes, toujours inattendues, des personnes qu'on place sur votre chemin, souvent dans les moments où la vie vous met à l'épreuve. Je crois bien que c'est à ce moment-là qu'on s'est rencontré : Alex, Marie, Greg et Hugo et je ne vous remercierai jamais assez pour tout.

Alex, je ne sais par où commencer. Je te trouve simplement exceptionnel (et j'ai choisi mes mots !) et notre amitié est devenue si importante à mes yeux que je compte bien la faire perdurer longtemps. Je crois que ça a tout de suite matché entre nous, comme un gros coup de cœur amical. Et entre notre amour pour la danse sur les classiques des années 80 à 2000, pour Ryan Gosling, pour la bonne bouffe et pour le rire, ça ne pouvait que bien grandir. J'ai hâte de poursuivre le chemin de la vie avec toi à mes côtés, sauf pour les concerts de Mylène Farmer, sur ce coup, ne compte toujours pas sur moi !

Marie, quelle sublime rencontre. Ma compatriote de plage, de festivals de toute taille, de soirées filles, de soirées musique, de soirées foot, on en a partagé des supers moments ensemble ! Merci d'avoir accepté le camping pendant 3 jours, en partie pour moi, et merci d'avoir été ma +1 pour tous ces événements qui enrichissent la tête et le cœur. Les soirées filles en terrasse me sont précieuses et vont me manquer, et d'ailleurs je ne te dois pas encore un verre par hasard ?!

Greg, le papa du groupe. On sait tous que tu es le coordinateur de nos soirées et souvent finalement le moins sage d'entre nous. Et sans ces soirées, qui sait comment j'aurai vécu cette thèse ! Certainement moins bien que ce qu'elle a été ! Merci d'avoir été l'organisateur de ces moments

de partage et d'y avoir amener toute ta générosité et ta bonne humeur légendaire quand il s'agit de ne pas travailler !

Hugo, tu es le plus attachant de la bande. On s'est surtout rapproché par notre amour de la musique urbaine et notre - mental de sudiste -, mais j'ai découvert une personne fantastique sous ses airs faussement rebelles, et à qui je tiens énormément finalement. C'est dingue comme tu peux être parfois fatigant comme un enfant au quotidien mais s'avérer être un mec si mature, intelligent et intéressant quand on creuse un peu. Même si t'as honte de trainer avec les « vieux », moi j'ai adoré partager tant de moments de vie avec toi, ça m'empêche de vieillir trop vite : - Chiller c'est sacré, ne viens pas nous déranger - Je continuerai évidemment mon rôle de maman de substitution comme disent les autres, pas besoin d'explication, notre relation est particulière je crois, mais j'y suis attachée, du moins tant que tu ne m'entraînes pas dans les pogos !

Margaux, ma petite stagiaire devenue grande. Quelle chance j'ai eu de t'avoir en stage, ça a permis le début de notre belle relation amicale. Catherine et Liliane ont fait des ravages ensemble au labo ! On se correspond sur beaucoup de points, et pas que sur la bouffe ! Merci d'avoir été là pour moi cette dernière année et de m'avoir supporté pendant mes bons et surtout mes mauvais jours. Je suis fière de toi et de te voir évoluer dans le milieu avec grande réussite ! Je serai là pour toi pour la suite de cette thèse, je sais que tu es forte et que tu surmonteras les épreuves que t'impose la vie. Je serai aussi à tes côtés pour avancer dans la vie à l'extérieur et j'ai hâte de découvrir les belles choses qu'elle te réserve !

Philippe, une des plus belles rencontres de ce labo. Non, je ne t'ai pas oublié, même si tu as choisi de t'expatrier outre-atlantique en y laissant QueenB sur le carreau. Je crois que j'ai passé tous mes samedis soirs avec toi pendant 4 mois ici, voir même des jeudis soirs à n'en dormir que 2h mais c'était clairement la Golden ! Aujourd'hui, tu me poursuis encore et, au minimum, 1h au téléphone par semaine. Et qu'est ce que je ris, partage, échange, et m'enrichis dans chacun de ces moments partagés, même à distance ! Les retrouvailles risquent d'être survoltées mais j'ai si hâte de te voir débarquer dans ta chemise de lin et tes mocassins, qu'on aille déguster du vin qui a du coffre et qu'on se perde dans des discussions jusqu'à pas d'heure pour rattraper le temps, et qui sait peut-être finir au bar gay avec du pain !

Geoffrey, seulement une année passée à tes côtés mais j'ai été ravie de faire ta connaissance et de libérer un mini quart de mon bureau pour le partager avec toi. J'ai surtout adoré partager des moments de convivialité avec toi et ta poule à l'extérieur. Belle route à New York, on s'y retrouve

en décembre pour le nouvel an, n'oublies pas de préparer la chambre d'amis (enfin le matelas gonflable dans ton futur 12m²...), on débarque !

Flo, même si tu sembles toujours débordé et pris par le travail, je sais que tu es à l'écoute quand on en a besoin et pour cela je te remercie. Je retiens surtout les numéros de clown à San Diego où j'ai travaillé mes abdos plus que je ne le fais à la salle chaque semaine, mais aussi les soirées du trio avec Emilie à l'extérieur où tu révèles enfin la personnalité de notre Floflo qu'on adore ! J'espère encore continuer à partager des moments à l'extérieur avec toi et Emilie, qui s'avèrent les moments les plus précieux.

Un merci à Giulia, bellissima, pour ton énergie, ton sourire et ta joie de vivre au quotidien.

Un merci à Guillaume, le sauveur de nos animaux préférés. Sous tes airs de métalleux, j'y ai découvert une personnalité sensible et très attachante. Merci d'avoir pris soin de mes petites bêtes à la perfection, et à très vite pour une pinte avec Paulo !

Une pensée particulière également pour Audrey (merci pour ta disponibilité et ton côté protecteur), POF (j'aurai adoré travailler plus avec toi), Sandra, Greg, Federico, les Nathalie(s), Frédo, les Ichas, Ludivine, Violaine, Mathieu et les autres étudiants parmi tant d'autres.

Merci également à tous les autres membres de l'équipe ou de l'institut qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

-

Evidemment, toutes les personnes qui ont contribué à ce travail de longue haleine et qui partagent les moments les plus importants de ma vie ne se concentrent pas au laboratoire. Le soutien de l'ombre est souvent le plus important et chacun d'entre vous a contribué à la réussite de cette aventure.

Les premiers, si ce n'est les plus importants et les plus merveilleux à mes yeux, c'est bien vous Alex et Kelly. Vous n'imaginez pas combien vos appels hebdomadaires étaient importants pour moi et permettaient de me défouler dans vos oreilles attentives tout en ayant l'impression de ne jamais vous avoir laissé loin de moi. Alex, tu connais comme moi la valeur de notre amitié depuis plusieurs années maintenant, et surtout le sens commun que l'on donne à ce genre de relation. Kelly, notre amitié sans faille qui perdure et se renforce d'année en année, est inestimable pour

moi. Merci à vous deux pour votre soutien depuis toutes ces années, dans les bons comme dans les plus mauvais moments pour moi. Vous connaissez tout de moi et malgré tout, vous êtes toujours là pour me faire avancer. Merci pour votre force et votre amour, sans lesquels je n'y serais pas arrivée.

Dorian, merci pour ton soutien indéfectible durant tout ce temps, dans tous les moments de la vie. Ton amitié m'est très précieuse et m'apporte beaucoup alors merci d'être resté à mes côtés.

Merci à Fabien, le dernier boy de cette joyeuse bande, dans ta vie parisienne à mille à l'heure, les quelques moments de retrouvaille et de partage m'ont fait un bien fou.

Merci à toutes les filles de cette famille : Anne-sophie, Charlotte, Marion, Anne-Laure, Charlène et bien sûr Sandra. Anne-so, ma bichette, tu as été présente notamment dans les moments les plus difficiles pour moi, merci pour cette amitié sincère et profonde qui saura de nouveau grandir dans les années à venir. Charlotte, merci pour ton soutien, nos retrouvailles au cours de ces trois années ont été une bouffée d'air frais à chaque fois et m'ont reboostée au maximum ! Marion, je te remercie pour ta fraîcheur et ta gentillesse à tout moment, ainsi que ton écoute qui a été si précieuse pendant ces trois années. Anne-Laure, Babyyy, même à l'autre bout du monde : tu es toujours une bouffée d'air frais et d'insouciance qu'il est tellement bon de retrouver ! Charlène, partager nos galères de thèse m'a fait un bien fou, enfin quelqu'un qui pouvait me comprendre à l'extérieur alors merci pour ces échanges et ton soutien ! Sandra, ma Sandrou, même si au Panama tu galères avec les gens de petite taille, tu as su me soutenir et on a su maintenir cette amitié précieuse, reviens-nous vite Magic boule ! Une dernière pensée pour Meïwen, le rayon de soleil du groupe, qu'il a été bon de retrouver ces dernières années !

Une pensée emplie d'amour à ma compatriote de pintes quasi hebdomadaires pendant 2 ans : Camille, tu as été mon repère n°1 dans la ville et un fort et précieux soutien ici à Bordeaux pendant tout ce temps alors merci pour ces heures interminables de discussion et pour ton amitié.

Merci à Rébecca, mon amie de toujours et mon repère de vie à l'infini. Même si tu ne comprends absolument rien de ce que j'ai fait pendant trois ans, ton soutien indéfectible depuis 25 ans n'a pas de prix. Merci d'avoir été et d'être toujours présente à mes côtés.

Merci à Sandra, mon deuxième pilier au pays basque. Merci pour ton soutien à toute épreuve et pour ton amitié si précieuse, qui perdurent depuis de nombreuses années.

Une pensée pour mes copines d'antan et de temps en temps : Popo & Manon et Clara, Naïs, Manon et Ana que j'ai hâte de retrouver au plus vite. Une pensée également pour Lilian et Sarah.

-

Et puis, il y a une rencontre encore plus inattendue que les autres et qui prend une place grandissante dans les derniers mois de cette aventure. Je pense que tu ne t'attendais pas à te retrouver sur quelques lignes de ce manuscrit, mais rassure-toi, moi non plus. J'aurai mille mercis à t'offrir mais simplement merci pour ton soutien, pour ta force, pour tous ces moments idylliques et pour ton amour qui m'ont propulsé vers l'avant dans cette dernière année de thèse. Il n'y a que quand on est bien dans sa tête et ses baskets qu'on peut montrer le meilleur de soi-même dans tous les domaines, et devine-quoi, tu as juste grandement contribué à cet épanouissement alors merci pour l'équilibre que tu apportes à ma vie aujourd'hui. Bien que tu ne comprennes que peu de choses à ce que je fais ou à ce que j'ai écrit ici, tu as été mon soutien de l'ombre au quotidien cette dernière année. Tout cela paraît fou, mais c'est si beau la folie.

-

Enfin, finissons par les personnes qui restent les plus importantes dans ma vie de jeune femme. Merci à tous mes proches d'avoir été présents à mes côtés pendant ces trois années sans vraiment comprendre ce que j'y faisais à part « travailler sur la maladie de Parkinson ».

Amatxi, Aitatxi, Papi et Mamie, quelle chance de vous avoir encore à mes côtés et quelle fierté de pouvoir vous montrer ce que j'ai accompli pendant trois années. Merci pour les valeurs familiales inculquées et si chères à mon cœur.

Papa, Maman, il y a des choses qu'on ne se dit pas mais sachez que votre soutien indéfectible a été de loin le plus important. Merci pour vos encouragements depuis toujours pour aller encore plus loin et toujours de l'avant, pour votre force et votre amour qui font pousser des ailes à tout instant.

Steph, notre relation n'est peut-être pas la plus fusionnelle du monde, mais elle est emplie d'amour à notre façon. Ton soutien puissant dans tous les moments et surtout les plus difficiles a été la plus belle preuve d'amour pour moi. Benoît, mon Loulou, il n'y a pas plus grande valeur, motivation et plus grand soutien que de voir la fierté dans les yeux de son frère. Je suis si fière de vous deux, de ce que vous accomplissez et de ce que vous êtes.

Maité Zaitut.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
RESUME	13
ABSTRACT	14
LISTE DES PUBLICATIONS, POSTERS ET COMMUNICATION ORALE	15
LISTE DES ABREVIATIONS :	17
AVANT-PROPOS :	19
INTRODUCTION	21
I. LES SYNUCLEINOPATHIES :	23
HISTORIQUE	23
EPIDEMIOLOGIE	25
ETIOLOGIE	26
ANATOMO-PATHOLOGIE	32
DIAGNOSTIC	36
TRAITEMENTS ACTUELS	38
II. LA PROTEINE A-SYNUCLEINE : L'HYPOTHESE « PRION-LIKE »	39
L'A-SYNUCLEINE PHYSIOLOGIQUE	39
L'HYPOTHESE « PRION-LIKE » DE L'A-SYNUCLEINE PATHOGENIQUE	43
EFFETS TOXIQUES CELLULAIRES LIEES A L'A-SYNUCLEINE	51
APPROCHES THERAPEUTIQUES ENVISAGEES POUR LUTTER CONTRE L'A-SYNUCLEINE PATHOLOGIQUE	53
III. L'AUTOPHAGIE : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE COMMUNE POTENTIELLE POUR TOUTES LES SYNUCLEINOPATHIES	54
LA DEGRADATION DE L'A-SYNUCLEINE	54
L'AUTOPHAGIE : UNE MACHINERIE SURMENEES DANS LES SYNUCLEINOPATHIES	59
DYSHOMEOSTASIE AUTOPHAGIQUE ET NEURODEGENERESCENCE	68
STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUR RETABLIR LA MACHINERIE CELLULAIRE DE DEGRADATION	71
OBJECTIFS DE LA THESE	75
RESULTATS	77
<u>PARTIE 1 : ETUDE DES MECANISMES CELLULAIRES SOUS-JACENTS A LA NEURODEGENERESCENCE LIEE A L'A-SYNUCLEINE</u>	<u>79</u>

<i>PROJET 1 : EVALUATION D'UN NOUVEAU MODELE MURIN DE SYNUCLEINOPATHIE A PARTIR D'INOCULATION DE FRACTIONS DE CORPS DE LEWY PURIFIES A PARTIR DE TISSUS POST-MORTEM DE CORTEX CINGULAIRE DE PATIENTS PARKINSONIENS.....</i>	81
1. CONTEXTE DE L'ETUDE :	81
2. OBJECTIF DE L'ETUDE :	82
3. DESIGN EXPERIMENTAL :	82
4. RESULTATS :	84
5. DISCUSSION DE L'ETUDE :	90
6. CONCLUSION DE L'ETUDE :	91
<i>PROJET 2 : EVALUATION DES MECANISMES SOUS-JACENTS IMPLIQUES DANS LA NEURODEGENERESCENCE INDUITE PAR L'A-SYNUCLEINE DANS UN MODELE PRIMATE NON-HUMAIN DE MALADIE DE PARKINSON.....</i>	93
<i>PROJET 3 : EVALUATION DES TAUX DE METAUX DANS LA SUBSTANCE NOIRE DE DIFFERENTS MODELES DE SYNUCLEINOPATHIE.....</i>	97
1. CONTEXTE DE L'ETUDE :	97
2. OBJECTIF DE L'ETUDE :	97
3. DESIGN EXPERIMENTAL :	98
4. RESULTATS :	99
5. DISCUSSION :	102
6. CONCLUSION :	103
<i>PROJET 4 : ETUDE DE LA PROPAGATION DE LA PROTEINE A-SYNUCLEINE ENTRE LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE.</i>	105
<u>PARTIE 2 : COMBATTRE L'ACCUMULATION DE L'A-SYNUCLEINE EN AUGMENTANT SA DEGRADATION VIA L'AUTOPHAGIE</u>	107
<i>PROJET 5 : EVALUATION DE LA DYSFONCTION AUTOPHAGIQUE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'ATROPHIE MULTISYSTEMATISEE.....</i>	109
1. CONTEXTE DE L'ETUDE :	109
2. OBJECTIF DE L'ETUDE :	109
3. DESIGN EXPERIMENTAL :	110
4. RESULTATS :	111
5. DISCUSSION :	113
6. CONCLUSION :	115
<i>PROJET 6 : CIBLER LA SUREXPRESSON DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION EB COMME STRATEGIE THERAPEUTIQUE COMMUNE AUX SYNUCLEINOPATHIES</i>	117
<i>PROJET 7 : AUGMENTER LA DEGRADATION DE LA PROTEINE A-SYNUCLEINE PAR INDUCTION DE L'AUTOPHAGIE VIA LE TREHALOSE.....</i>	121
1. CONTEXTE DE L'ETUDE :	121
2. OBJECTIF DE L'ETUDE :	122
3. DESIGN EXPERIMENTAL :	122
4. RESULTATS :	124
5. DISCUSSION :	128
6. CONCLUSION :	129

<u>PARTIE 3 : COMPRENDRE LA MECANISTIQUE CELLULAIRE POUR MIEUX COMBATTRE LES EFFETS PLEIOTROPES DANS LES SYNUCLEINOPATHIES</u>	<u>131</u>
1. CONTEXTE DE L'ETUDE :	133
2. OBJECTIF DE L'ETUDE :	135
3. RESULTATS PRELIMINAIRES :	135
4. FUTURES DIRECTIONS DE L'ETUDE :	137
<u>DISCUSSION</u>	<u>139</u>
<u>CONCLUSION.....</u>	<u>154</u>
<u>ARTICLES DIDACTIQUES</u>	<u>155</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>157</u>

RESUME

Mon projet de thèse a été dédié à l'étude des synucléinopathies. Ces maladies neurodégénératives sont caractérisées par la présence d'inclusions intracytoplasmiques positives pour l' α -synucléine et contenues dans les neurones pour la maladie de Parkinson (i.e. les corps de Lewy) ou dans les oligodendrocytes pour l'atrophie multisystématisée (i.e. les inclusions cytoplasmiques oligodendrogiales). L'objectif de mon travail de thèse fut de proposer une approche multifactorielle et translationnelle en développant les aspects de modélisation, de mécanistique et de thérapeutique associée aux synucléinopathies. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à disséquer les mécanismes sous-jacents à la neurodégénérescence induits par la protéine α -synucléine dans un modèle primate non-humain de la maladie de Parkinson. Nous avons ainsi souligné le rôle toxique de la protéine α -synucléine et mis en lumière de nouveaux processus cellulaires impliqués dans le phénomène de neurodégénérescence. Dans ce même modèle animal, nous avons étudié l'hypothèse d'une propagation de la pathologie induite par l' α -synucléine entre les systèmes nerveux central et périphérique. Nous avons ainsi pu démontrer l'existence d'une route bidirectionnelle de propagation et de neurodégénérescence de la protéine α -synucléine entre les deux systèmes nerveux, pouvant corroborer la présence de symptômes non moteurs précoces au cours de la pathologie. Enfin, nous nous sommes concentrés sur le rétablissement de la fonction autophagique comme cible thérapeutique commune aux synucléinopathies. Nous avons ainsi pu démontrer qu'une restauration de la machinerie de dégradation de la voie autophagique était suffisante pour rétablir les taux physiologiques de la protéine α -synucléine et induire une neuroprotection dans un modèle rongeur de la maladie de Parkinson et d'atrophie multisystématisée. Ces travaux corroborent le rôle clé de la protéine α -synucléine dans l'étiologie des synucléinopathies et proposent de nouvelles stratégies thérapeutiques communes à toutes les synucléinopathies afin de rétablir les niveaux physiologiques cellulaires de la protéine et induire une neuroprotection au sein du système nerveux central.

Mots-clés : neuropathologie, neurodégénérescence, synucléinopathie, mécanistique, thérapeutique.

ABSTRACT

My thesis project was dedicated to the study of synucleinopathies. Synucleinopathies are neurodegenerative diseases characterized by the presence of α -synuclein-positive intracytoplasmic inclusions which are present either in neurons for Parkinson's disease (i.e. Lewy Bodies) or in oligodendrocytes for Multiple system atrophy (i.e. Glial Cytoplasmic Inclusions). The aim of my work was to establish a multifactorial and translational approach through modeling, mechanistic and therapeutic aspects associated with synucleinopathies. First, we focused on dissecting the underlying α -synuclein-mediated mechanisms of neurodegeneration using a non-human primate model of Parkinson's disease. We confirmed the toxic role of α -synuclein in the pathology and highlighted unpredictable cellular processes involved in neurodegeneration. Using the same Parkinson's disease model, we studied the hypothesis of a pathological propagation of α -synuclein between the central and peripheral nervous systems in an attempt to decipher the initiation point and the direction of propagation of the associated pathology. We thus demonstrated a bidirectional route of propagation of α -synuclein between the central and peripheral nervous systems. Finally, we focused on the restoration of the autophagic function as a potential common therapeutic target for all synucleinopathies. Through a gene-based restoration of autophagy, we efficiently reestablished α -synuclein physiological protein levels, while inducing neuroprotection in Parkinson's disease and Multiple system atrophy rodent models. Thus, this work corroborates the key role of α -synuclein in the etiology of synucleinopathy and offers new common therapeutic strategies for all synucleinopathies to decrease α -synuclein-induced toxicity in the central nervous system.

Keywords: neuropathology, neurodegeneration, synucleinopathy, mechanistic, therapeutic.

Liste des publications, posters et communication orale

Articles publiés :

Arotcarena M-L and Dehay B. (2018) Les synucléinopathies sont-elles des maladies à prions ? Pratique Neurologique FMC. <https://doi.org/10.1016/j.praneu.2018.02.006>

Arotcarena M-L, Teil M and Dehay B. (2019) Autophagy in Synucleinopathy: The Overwhelmed and Defective Machinery. Cells (2019), 8(6), 565; <https://doi.org/10.3390/cells8060565>

Article sous presse :

Arotcarena M-L[†], Bourdenx M[†], Thiolat M-L, Doudnikoff E, Dovero S, Ballabio A, Fernagut P-O, Meissner W.G, Bezard E and Dehay B. (2019) Transcription factor EB overexpression prevents neurodegeneration in experimental synucleinopathies. **JCI Insight (In press)** (†co-first authors)

Articles en cours de publication :

Arotcarena M-L[†], Dovero S[†], Prigent A[†], Bourdenx M[†], Camus S, Porras G, Thiolat M-L, Tasselli M, Aubert P, Kruse N, Mollenhauer B, Trigo Damas I, Estrada C, Garcia-Carrillo N, Trinidad Herrero M, Vila M, Obeso J.A, Derkinderen P, Dehay B and Bezard E. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of α -synuclein pathology in non-human primates. (†co-first authors)

Bourdenx M[†], Nioche A[†], Dovero S[†], **Arotcarena M-L**[†], Camus S, Porras G, Thiolat M-L, Rougier N.P, Prigent A, Aubert P, Bohic S, Sandt C, Laferrière F, Doudnikoff E, Kruse N, Mollenhauer B, Novello S, Morari M, Leste-Lasserre T, Trigo Damas I, Goillandeau M, Perier C, Estrada C, Garcia-Carrillo N, Recasens A, Vaikath N.N, El-Agnaf O.M.A, Trinidad Herrero M, Derkinderen P, Vila M, Obeso J.A, Dehay B, Bezard E. Machine learning reveals pathological signatures induced by patient-derived α -synuclein structures. (†co-first authors)

Posters :

Assessment of TFEB-mediated neuroprotective effect in Multiple system atrophy mouse model. **M-L. Arotcarena**, M. Bourdenx, S. Dovero, P-O. Fernagut, E. Bezard and B. Dehay. IBAGS meeting, Biarritz, April 2019.

Assessment of TFEB-mediated neuroprotective effect in Multiple system atrophy mouse model. **M-L. Arotcarena**, M. Bourdenx, S. Dovero, P-O. Fernagut, E. Bezard and B. Dehay. 48th annual meeting of the society for neuroscience, San Diego, November 2018.

Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of α -synuclein pathology in nonhuman primates. **M-L Arotcarena**, S. Dovero, A. Prigent, M. Bourdenx, S. Camus, G. Porras, M-L Thiolat, M. Tasselli, P. Aubert, N. Kruse, B. Mollenhauer, I. Trigo Damas, C. Estrada, N. Garcia-Carrillo, N. N. Vaikath¹, O. M. A. El-Agnaf, M. T. Herrero, M. Vila, J. A. Obeso, P. Derkinderen, B. Dehay and E. Bezard. Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, Hong Kong, October 2018.

Machine learning reveals different pathological signatures of patient-derived α -synuclein extracts in non-human primates. M. Bourdenx, S. Dovero, A. Nioche, **M-L. Arotcarena**, S. Camus, G. Porras, M-L Thiolat, N.P. Rougier, A. Prigent, P. Aubert, S. Bohic, N. Kruse, B. Mollenhauer, S. Novello, M. Morari, I. Trigo Damas, M. Goillandeau, M. Tasselli, C. Perier, N. Garcia Carrillo, C. Estrada, A. Recasens, J. Blesa, M.T. Herrero, P. Derkinderen, M. Vila, J.A. Obeso, B. Dehay and E. Bezard. Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, Hong Kong, October 2018.

Assessment of TFEB-mediated neuroprotective effect in Multiple system atrophy mouse model. **M-L. Arotcarena**, M. Bourdenx, S. Dovero, P-O. Fernagut, E. Bezard and B. Dehay. Journée scientifique de l'Ecole Doctorale de Bordeaux, April 2018. *Ce poster a été sélectionné pour la compétition du meilleur poster (10 sélectionnés).*

Biochemical characterization of extractive aggregates in synucleinopathies and animal model. F. Laferrière, F. Ichas, F. De Giorgi-Ichas, **M-L. Arotcarena**, B. Dehay, E. Bezard. Innovative Medicines Initiatives IMPRiND congress, March 2018.

Variable selection using Machine Learning to identify new signatures of patient-derived aggregated α -synuclein-induced neurodegeneration in non-human primates. M. Bourdenx, S. Dovero, A. Nioche, **M-L. Arotcarena**, S. Camus, G. Porras, M-L Thiolat, N.P. Rougier, A. Prigent, P. Aubert, S. Bohic, N. Kruse, B. Mollenhauer, S. Novello, M. Morari, I. Trigo Damas, M. Goillandeau, M. Tasselli, C. Perier, N. Garcia Carrillo, C. Estrada, A. Recasens, J. Blesa, M.T. Herrero, P. Derkinderen, M. Vila, J.A. Obeso, B. Dehay and E. Bezard. 47th annual meeting of the society for neuroscience, Washington, 2017.

Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of α -synuclein pathology in non-human primates. S. Dovero, A. Prigent, **M-L. Arotcarena**, M. Bourdenx, P. Aubert, I. Trigo, G. Porras, M-L Thiolat, M. Tasselli, N. Garcia Carrillo, C. Estrada, A. Recasens, J. Blesa, M. Trinidad Herrero, M. Vila, J.A. Obeso, P. Derkinderen, B. Dehay and E. Bezard. 47th annual meeting of the society for neuroscience, Washington, 2017.

Communication orale :

Club des Ganglions de la Base (CGB Meeting) Biarritz, 28th April 2019 – “TFEB-driven expression prevents neurodegeneration in a multiple system atrophy mouse model”

Liste des abréviations :

α-syn	α -synucléine - alpha-synucléine
AMS	atrophie multisystématisée
AMS-c	atrophie multisystématisée de phénotype cérébelleux
AMS-p	atrophie multisystématisée de phénotype parkinsonien
Atg	autophagy related gene - gène lié à l'autophagie
ATP13A2	ATPase 13A2 transporteuse de cations
CMA	chaperone-mediated autophagy - autophagie médiée par les protéines chaperons
DLB	dementia with Lewy Bodies - démences à corps de Lewy
GCase	β -glucocérébrosidase
GCI	glial cytoplasmic inclusions - inclusions cytoplasmiques gliales
Hsc70	heat shock cognate 70 kDa protein
LAMP	lysosomal associated membrane protein
LB	Lewy Body- corps de Lewy
LC3	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
LCR	liquide céphalo-rachidien
LN	Lewy Neurite - corps de Neurite
LRRK2	Leucine-Rich Repeat Kinase 2
MA	macroautophagie
MP	maladie de Parkinson
mTOR	mammalian target of rapamycin
SNpc	substance noire pars compacta
TFEB	transcription factor EB

Avant-propos :

Du fait du vieillissement de la population et de l'allongement de l'espérance de vie, la prévalence des synucléinopathies, dont le facteur de risque majeur est l'âge, augmente au cours de ces dernières années. Ces maladies neurodégénératives, dont les plus connues sont la maladie de Parkinson et l'atrophie multisystématisée, constituent un enjeu de santé publique et sociétal avec un impact socio-économique important. Néanmoins, ces pathologies restent à ce jour incurables, et seuls des traitements symptomatiques sont proposés aux patients. Face à ces constats, mon travail de thèse a consisté à améliorer la connaissance mécanistique de ces pathologies et à proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

Mon expérience en école d'ingénieur en biologie m'a fait prendre conscience de l'intérêt décroissant des industries pharmaceutiques envers ces pathologies de par le manque de connaissances mécanistiques et de cibles thérapeutiques encourageantes apportées par la recherche publique, malgré les considérables découvertes dans le domaine. La confrontation à cette réalité m'a poussé à intégrer le monde de la recherche académique. J'ai ainsi contacté le Dr. Bezard afin d'intégrer son équipe « Physiopathologie des syndromes parkinsoniens » pour mon stage de fin d'étude d'école d'ingénieur en biologie. Ma rencontre avec le Dr. Dehay et les membres de l'équipe, ainsi que la découverte de l'approche de recherche translationnelle menée dès mes projets de stage m'ont incité à poursuivre ce travail par une thèse. Forte de cette expérience et aidée par ma connaissance de l'équipe, de son fonctionnement et des outils techniques utilisés, j'ai ainsi pu travailler sur plusieurs projets en parallèle au cours de cette thèse.

Pour mon manuscrit de thèse, j'ai décidé d'introduire de manière générale les synucléinopathies dans une première partie afin d'y reconnaître les points communs et les différences. J'ai ensuite décidé d'introduire l'hypothèse dite « prion-like » présente pour ces pathologies, et sur laquelle repose de nombreux projets de thèse que j'ai menés. Pour finir l'introduction, j'ai choisi de mettre en lumière l'autophagie comme cible thérapeutique intéressante commune pour ces pathologies. Enfin, j'ai développé les différents résultats expérimentaux obtenus durant ces années de thèse en trois axes, en y insérant les différents articles didactiques que j'ai eu l'opportunité d'écrire au cours de ce travail, avant de clore le manuscrit par une discussion générale sur le domaine.

INTRODUCTION

I. Les synucléinopathies :

Le terme synucléinopathie désigne un ensemble de maladies neurodégénératives caractérisées par la présence d'inclusions intracytoplasmiques positives pour la protéine alpha-synucléine (α -syn) au sein du système nerveux central. Ce groupe de maladies est constitué de : la maladie de Parkinson (MP), l'atrophie multisystématisée (AMS) et les démences à corps de Lewy (*Dementia with Lewy Bodies* – DLB).

Historique

La maladie de Parkinson (MP) a été cliniquement décrite pour la première fois en 1817 par James Parkinson dans son écrit « An essay of the Shaking Palsy » (**James Parkinson, The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences, 2002**). Il décrit la pathologie comme étant :

“Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forward, and to pass from awalking to a running pace: the senses and intellects being uninjured“

Il présente ensuite dans son œuvre six cas de patients soulevant trois caractéristiques communes utilisées aujourd'hui encore dans la détermination de la maladie : les tremblements au repos, l'instabilité posturale et l'akinésie (difficulté à initier un mouvement sans faiblesse musculaire) associée à la rigidité musculaire. Cinquante ans plus tard, Jean Martin Charcot établit le quatrième point cardinal de la pathologie : la bradykinésie, c'est-à-dire un ralentissement des mouvements et une perte de la finesse des mouvements telle que pour la tâche d'écriture. Charcot sera le premier à utiliser le terme de « maladie de Parkinson » pour désigner cette pathologie, remplaçant ainsi le terme de « Shaking Palsy » (**Charcot, Oeuvres complètes - Leçons sur les maladie du système nerveux, 1872**). Dans les années 1880, William Growers décrivit pour la première fois l'aspect démographique de la pathologie par l'étude de quatre-vingt cas dans sa clinique londonienne (**Pearce, Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 1989**). Il détermina la prépondérance de l'apparition de la maladie chez les hommes, l'initiation de la pathologie à l'âge de 50-60 ans pour la moitié des cas et une cause potentiellement héréditaire dans 15% des cas étudiés. D'un point de vue neuropathologique, Edouard Brissaud sera le premier à proposer la substance noire comme épïcètre de la maladie dès 1895 : « *a lesion of the locus niger could very well be the anatomical basis of Parkinson's disease* » (**Goetz, Cold Spring Harb Perspect Med,**

2011). Son hypothèse sera étayée dès les années 1920 par l'étude post-mortem de cerveaux de neuf cas parkinsoniens par Konstantin Trétiakoff (**Tretiakoff, Theses de Paris, 1919**). En 1912, le neurologue germano-américain Fritz Jacob Heinrich Lewis publia, dans Lewandowsky's Handbook of Neurology (**Lewy, Pathologische anatomie Handbuch der neurologie, 1912**), une étude décrivant la présence d'inclusions intra-neuronales particulières, compactes et sphériques, au sein du système nerveux de patients parkinsoniens, correspondant aux corps de Lewy, seconde caractéristique de la maladie aujourd'hui. Enfin, en 1953, Greenfield et Bosanquet ont réalisé l'analyse pathologique la plus complète en décrivant pour la première fois la progression clinique de la maladie de Parkinson à travers différents stades de progression clinique : pathologie unilatérale (stade I), pathologie bilatérale (stades II-V), indiquant le développement de l'instabilité posturale (stade III) comme un point de non-retour de la pathologie (**Greenfield & Bosanquet, Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 1953**).

Concernant l'atrophie multisystématisée (AMS), Jean-Martin Charcot et ses étudiants avaient déjà décrit, dès 1872, des variants de la pathologie parkinsonienne avec notamment des cas présentant des similitudes avec des symptômes liés à l'atrophie multisystématisée (**Charcot, Oeuvres complètes - Leçons sur les maladie du système nerveux, 1872**). Cependant, le terme d'atrophie multisystématisée a été proposé pour la première fois en 1969 par Graham et Oppenheimer pour regrouper des maladies neurodégénératives précédemment décrites distinctivement telles que la dégénérescence nigro-striée, l'ataxie olivo-ponto-cérébelleuse et le syndrome de Shy-Drager. Dans cet article, ils décrivent le cas d'un homme âgé de 60 ans qui développe une maladie neurodégénérative progressive présentant une ataxie cérébelleuse ainsi que des troubles autonomes. Par une analyse post-mortem du tissu cérébral, ils observent une perte neuronale sur plusieurs sites du système nerveux tels que le putamen, ou au niveau de la moelle épinière, notamment au niveau des colonnes intermedio-latérales. Après comparaison avec différents cas publiés précédemment, ils établissent le terme d'atrophie multisystématisée pour désigner les cas dont le point commun est une atrophie olivo-ponto-cérébelleuse et une perte neuronale au niveau des noyaux autonomes du système nerveux.

Les démences à corps de Lewy furent elles caractérisées pour la première fois en 1961 par Okazaki et ses collaborateurs (**Okazaki et al., Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1961**). Dans leur article, ils exposent le cas de deux patients atteints de démence dont le cerveau présente des corps de Lewy diffus. En 1976, le clinicien japonais Kosaka décrivit le cas d'un patient atteint de démence et dont le cerveau autopsié présente des plaques séniles, des corps

de Pick et des corps de Lewy, regroupant ainsi toutes les caractéristiques neuropathologiques des démences à corps de Lewy telles qu'on les connaît aujourd'hui (**Kosaka *et al.*, Acta Neuropathologica, 1976**). En 1984, il décrivit 40 cas supplémentaires atteints de démences à corps de Lewy et en 1988, Burkhardt et collaborateurs publièrent la première description des démences à corps de Lewy (**Burkhardt *et al.*, Neurology, 1988**).

Epidémiologie

La MP est la seconde maladie neurodégénérative la plus répandue dans le monde après la maladie d'Alzheimer. Sa prévalence est de 0.3% dans la population générale, et augmente avec l'âge : de 1% de la population âgée de plus de 60 ans jusqu'à 3% pour les personnes âgées de plus de 80 ans (**Tysnes & Storstein, J Neural Transm (Vienna), 2017**). L'incidence de la MP est de 8-18 individus sur 100 000 personnes par an (**de Lau & Breteler, The Lancet Neurology, 2006**). Seuls 3-4% de la population développent la maladie avant l'âge de 50 ans (**Alves *et al.*, Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2009, Van Den Eeden *et al.*, American Journal of Epidemiology, 2003**). En 2015, en France, la prévalence était de 2,5 pour 100 000 personnes et l'incidence annuelle était de 39 nouveaux cas pour 100 000 personnes. L'âge moyen d'apparition de la pathologie est de 60 ans avec une espérance de vie de 15 ans après le diagnostic de la maladie (**Lees *et al.*, The Lancet, 2009**). Les hommes sont plus affectés que les femmes avec une prévalence et une incidence supérieure de 1,5 à 2 fois. L'incidence et la prévalence de la MP ont augmenté au cours des deux dernières décennies, notamment dû au vieillissement de la population et aux nouveaux outils de diagnostic plus précis. Cependant, la distribution de la MP dans le monde est hétérogène selon les pays, notamment selon leur démographie mais aussi les facteurs de risque associés à leur industrialisation (**Dorsey *et al.*, The Lancet Neurology, 2018**) (**Figure 1**).

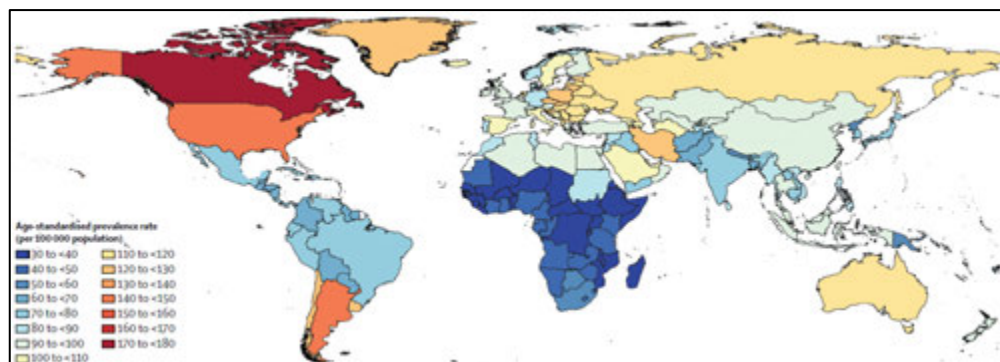


Figure 1 : Distribution mondiale de la prévalence de la maladie de Parkinson normalisée selon l'âge pour 100 000 habitants en 2016. D'après (Dorsey *et al.*, The Lancet Neurology, 2018**).**

Les études concernant l'AMS s'avèrent plus rares, de par sa classification et désignation tardive. La prévalence de cette pathologie est de 2-4 cas pour 100 000 personnes (**Schrag *et al.*, The Lancet, 1999, Tison *et al.*, The Lancet, 2000**) dont 81,5% sont concentrés chez les personnes âgées entre 60 et 79 ans (**Bower *et al.*, Neurology, 1997**). L'incidence annuelle de l'AMS représente 0,6 cas pour 100 000 personnes dans le monde, avec une augmentation jusqu'à 3 cas pour 100 000 personnes chez les personnes âgées de plus de 50 ans (**Bower *et al.*, Neurology, 1997**). L'âge moyen d'apparition de la pathologie est de 54 ans avec une durée de vie d'environ 7 à 9 ans après le diagnostic du patient (**Ben-Shlomo *et al.*, A meta-analysis, 1997, Wenning *et al.*, The Lancet Neurology, 2013**). Cette pathologie affecte également plus fréquemment les hommes que les femmes avec un ratio de 1,3:1 (**Wenning *et al.*, Movement Disorders, 1997**). Cette synucléinopathie est donc plus rare en termes de prévalence que la MP, s'initie plus tôt en termes d'âge et sa progression s'avère plus rapide que la MP.

Les démences à corps de Lewy constituent de 3,2 à 7,1% des cas de démences dans le monde et présentent une incidence annuelle de 0,5 à 1,6 pour 1000 personnes avec une prévalence qui varie entre 0.02 et 33.3 pour 1000 personnes, selon une revue récente (**Kane *et al.*, Alzheimers Res Ther, 2018**).

Etiologie

La cause des synucléinopathies reste à ce jour inconnue. L'âge reste cependant le facteur de risque majeur de ces maladies neurodégénératives. Le genre est aussi un facteur de risque de ces pathologies, qui s'avère plus élevé pour les hommes que pour les femmes, comme évoqué précédemment. Cependant, une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques est aujourd'hui suggérée comme initiateur des pathologies.

La MP et l'AMS sont majoritairement des formes sporadiques. Cependant des formes génétiques et familiales sont aussi recensées. Les formes génétiques de la MP représentent 10% des cas dans la population (**Table 1**).

La première forme familiale concerne une mutation ponctuelle dans le gène *PARK1/SNCA* sur le bras long du chromosome 4, codant pour la protéine α -syn, chez une famille italienne et trois familles grecques en 1997 (**Polymeropoulos *et al.*, Science, 1997**). Il s'agit de la substitution faux-sens de l'alanine par la thréonine en position 53 de la protéine (Ala53Thr). Depuis, cinq mutations supplémentaires sur le gène *SNCA* ont été recensées : Ala30Pro, Glu46Lys, His50Gln, Gly51Asp

et Ala53Glu (Appel-Cresswell *et al.*, **Movement Disorders**, 2013, Krüger *et al.*, **Nature Genetics**, 1998, Lesage *et al.*, **Annals of Neurology**, 2013, Pasanen *et al.*, **Neurobiology of Aging**, 2014, Proukakis *et al.*, **Neurology**, 2013). Ces mutations restent rares mais induisent une pathologie parkinsonienne qui ressemble soit aux cas sporadiques (Ala30Pro), ou bien plus précoce et associée à des symptômes secondaires tels que des démences ou des hallucinations. De plus, une duplication/triplication du gène *SNCA* est à l'origine de formes génétiques identifiées chez plusieurs familles, liant la quantité d' α -syn à la sévérité de la pathologie (Ibáñez *et al.*, **JAMA Neurology**, 2009, Singleton *et al.*, **Science**, 2003).

Outre le gène *SNCA*, d'autres gènes sont impliqués dans les formes familiales de la MP. On décompte notamment des mutations dans les gènes : *PARK8*, codant pour la protéine Leucine Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) à transmission autosomique dominante (Zimprich *et al.*, **Neuron**, 2004), *PARK2* codant pour la protéine Parkin (Hattori *et al.*, **Annals of Neurology**, 1998, Hattori *et al.*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1998, Kitada *et al.*, **Nature**, 1998, Leroy *et al.*, **Human Genetics**, 1998, Lücking *et al.*, **The Lancet**, 1998, Matsumine *et al.*, **American journal of human genetics**, 1997), *PARK6* codant pour la protéine PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) (Valente *et al.*, **The American Journal of Human Genetics**, 2001, Valente *et al.*, **Neurological Sciences**, 2002, Valente *et al.*, **Annals of Neurology**, 2002), *PARK7* codant pour la protéine DJ-1 (Bonifati *et al.*, **Science**, 2003, van Duijn *et al.*, **American journal of human genetics**, 2001), *PARK9* codant pour la protéine ATP13A2 (Ramirez *et al.*, **Nat Genet**, 2006), toutes à transmission autosomale récessive.

Concernant l'AMS, la présence de formes héréditaires de la pathologie est encore mise en doute, bien que des cas de transmission autosomale dominante ou récessive aient été reportés (Hara *et al.*, **JAMA Neurology**, 2007, Hohler & Singh, **Journal of Clinical Neuroscience**, 2012, Itoh *et al.*, **Neuropathology**, 2014, Soma *et al.*, **Journal of the Neurological Sciences**, 2006, Wüllner *et al.*, **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, 2009).

En dehors des facteurs de risque génétiques directement associés au développement héréditaire de la pathologie, des études d'association pangénomiques ont mis en évidence des polymorphismes génétiques qui augmentent le risque de développer ces pathologies. Parmi les gènes impliqués, des polymorphismes dans le gène *GBA* codant pour la protéine β -glucocerebrosidase (GCCase), retrouvés dans la maladie de Gaucher, ont été validés comme facteurs de risque importants pour la MP (Hruska *et al.*, **Hum Mutat**, 2008) et l'AMS (Mitsui *et al.*, **Annals of clinical and translational neurology**, 2015).

New designation	Clinical clues	Inheritance	Locus symbol
<i>Classical parkinsonism</i>			
PARK-SNCA	Missense mutations cause classical parkinsonism. Duplication or triplication of this gene cause early-onset parkinsonism with prominent dementia.	AD	PARK1
PARK-LRRK2	-	AD	PARK8
PARK-VPS35	-	AD	PARK17
<i>Early-onset parkinsonism</i>			
PARK-Parkin	Often present with dystonia, often in a leg	AR	PARK2
PARK-PINK1	Psychiatric features common	AR	PARK6
PARK-DJ1	-	AR	PARK7
<i>Atypical parkinsonism or complex phenotypes</i>			
PARK-ATP13A2	Kufor-Rakeb syndrome Parkinsonism, dystonia Additional clinical features: Supranuclear gaze palsy, spasticity/pyramidal signs, dementia, facial-faucial-finger minimyoclonus, dysphagia, dysarthria, olfactory dysfunction	AR	PARK9
PARK-DNAJC6	Occasional mental retardation and seizures	AR	PARK19
<i>Disorders that usually present with other phenotypes but can have predominant parkinsonism</i>			
PARK-GBA	Early-onset parkinsonism. Alternative or comorbid phenotype Gaucher's disease: bone lesions, hepatosplenomegaly, hematologic disorders	AR	None

Table 1 : Liste des cas parkinsoniens héréditaires les plus prévalents. AD: autosomal dominant. AR: autosomal recessive. Adapté de (Marras *et al.*, *Movement Disorders*, 2016)

En 1999, une étude génétique sur des couples de jumeaux monozygotes et dizygotes dont un des membres est atteint de la MP a été menée afin de déterminer le rôle de la génétique dans la transmission de la pathologie (Tanner *et al.*, *JAMA*, 1999). De manière intéressante, cette étude a conduit les auteurs à renier un potentiel rôle génétique dans la transmission de la pathologie chez ces jumeaux et à soulever des causes environnementales et épigénétiques comme composant majeur étiologique. Parmi les facteurs de risque environnementaux, une exposition à des métaux

lourds tels que le manganèse ou le fer, ou bien à des intrants chimiques tels que les pesticides, les herbicides et les insecticides s'est avérée être corrélée positivement avec le risque de développer la MP dans différentes études épidémiologiques (**Brown *et al.*, Environ Health Perspect, 2005**). Pour l'AMS, quelques études suggèrent également un lien entre des facteurs environnementaux et le risque de développer la pathologie (**Brown *et al.*, Environ Health Perspect, 2005, Jellinger, J Alzheimers Dis, 2018**).

Ainsi, l'étiologie des synucléinopathies n'est pas encore complètement identifiée et caractérisée bien qu'une association de facteurs génétiques et environnementaux semble déterminante dans le risque de développer ces maladies.

Symptomatologie

Les symptômes de la MP se composent de symptômes moteurs et non-moteurs. Parmi les symptômes moteurs déjà caractérisés par Parkinson et Charcot, on retrouve une tétrade de symptômes cardinaux que sont : la bradykinésie/akinésie, l'instabilité posturale, la rigidité musculaire et les tremblements de repos (**Jankovic, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008**) (**Figure 2A**).

La **bradykinésie** qui correspond à un ralentissement et une perte de finesse du mouvement est souvent associée à une **akinésie** correspondant à une difficulté à initier un mouvement. Il s'agit de la caractéristique clinique la plus répandue et facilement observable chez les patients parkinsoniens, qui se développe dès le début de la maladie. Elle englobe des difficultés à initier, planifier ou exécuter des mouvements du quotidien ou des tâches répétitives. Elle peut engendrer une perte d'expression faciale, de clignement d'œil ou une difficulté à avaler.

La **rigidité musculaire** est caractérisée par une hypertonie musculaire généralisée menant à une résistance augmentée dans la mise en œuvre des mouvements impliquant les articulations. La rigidité musculaire entraîne également des douleurs articulaires notamment au niveau de l'épaule. L'**instabilité posturale**, correspondant à des troubles de la posture et de l'équilibre, est généralement observée aux stades avancés de la pathologie. Elle s'illustre par un buste penché vers l'avant et un cou rigide, associés à une torsion des coudes et des genoux. Le développement du déséquilibre amène à l'apparition de chutes de plus en plus fréquentes au cours de la pathologie, facteur le plus handicapant pour la vie du patient.

Enfin, les **tremblements de repos** représentent le symptôme le plus facilement reconnaissable de la MP, bien qu'ils s'avèrent absents dans 15 à 30% des patients. Il s'agit de tremblement unilatéral, d'une fréquence de 4 à 6 hertz, souvent présent aux extrémités distales.

Des symptômes non moteurs sont également présents, parfois à des stades plus précoces de la MP (**Chaudhuri *et al.*, The Lancet Neurology, 2006**) (**Figure 2B**). Les patients atteints de la MP souffrent régulièrement de troubles du sommeil qui apparaissent dès les stades précoces de la pathologie, caractérisés par des somnolences excessives en journée et des troubles du comportement du sommeil par mouvements oculaires rapides la nuit. Une dysautonomie générale avec des vertiges orthostatiques, une anosmie, une constipation, un dysfonctionnement érectile ou de la vessie, et une hyperhidrose, est également présente à différents stades de la pathologie. Enfin, des troubles psychiatriques peuvent aussi survenir, notamment de dépression, d'anxiété ou d'apathie, ou l'apparition d'hallucinations visuelles ; ainsi que l'apparition de troubles cognitifs ou de démence dans 40% des cas aux stades les plus tardifs de la pathologie.

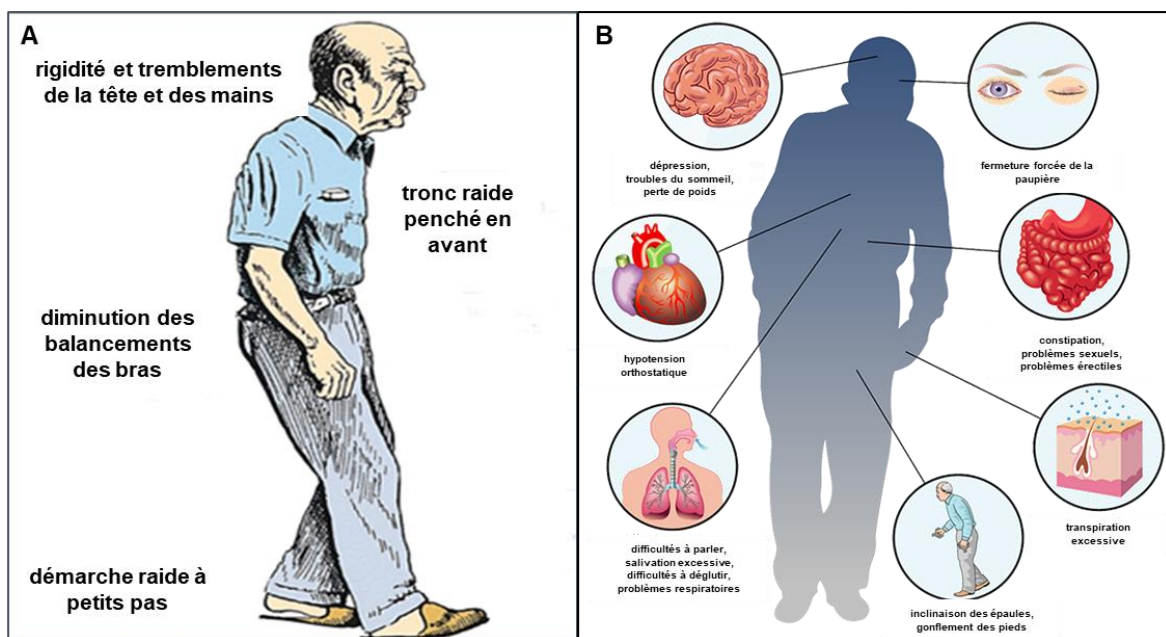


Figure 2 : Illustration des symptômes moteurs (A) et non-moteurs (B) pouvant être présents chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. D'après https://parkinsons.ie/Professionals_What_Is_Parkinsons

Les patients atteints de DLB diffèrent cliniquement des patients parkinsoniens par la prédominance de troubles cognitifs qui apparaissent précocement, en parallèle des symptômes moteurs.

L'examen clinique des patients atteints d'AMS permet de les diviser en deux sous-groupes selon les symptômes prédominants présents : les **AMS-parkinsoniens** (AMS-p) qui présentent majoritairement des troubles moteurs parkinsoniens, et les **AMS-cérébelleux** (AMS-c) qui présentent majoritairement des troubles moteurs cérébelleux. Malgré cette classification, 54% des patients AMS-p présenteraient des syndromes cérébelleux et 76% des patients AMS-c manifesterait un syndrome parkinsonien aux stades tardifs, suggérant un regroupement des troubles avec l'avancement de la pathologie.

Le **syndrome parkinsonien** présent dans environ 90% des cas d'AMS regroupe la même tétrade de symptômes moteurs que pour la MP, i.e une bradykinésie/akinésie, des tremblements de repos, une rigidité musculaire et une instabilité posturale.

Le **syndrome cérébelleux**, présent dans environ 60% des cas d'AMS se traduit par une ataxie, qui s'illustre par : une perte de la coordination des mouvements des membres, une démarche avec les jambes écartées, une perte de précision des mouvements des membres inférieurs et supérieurs, des mouvements involontaires saccadés du globe oculaire et des difficultés du langage par perte du contrôle des muscles de la phonation.

Enfin, dans 30 à 50% des cas atteints d'AMS, un syndrome pyramidal peut être observé avec la présence de réflexe plantaire anormal et un hyper-réflexe tendineux, désigné comme le signe de Babinsky.

De nombreux symptômes non moteurs se manifestent également chez les patients atteints d'AMS (**Figure 3**). Les plus fréquemment observés (dans 75-95% des cas) regroupent des **dysautonomies** présentes au niveau du système uro-génital (incontinence urinaire, troubles érectiles, ...) et cardiovasculaire (hypotension orthostatique, syncopes récurrentes, vertiges, ...). Des troubles digestifs (constipation), du sommeil (sommolences diurnes excessives, troubles du comportement du sommeil par mouvements oculaires rapides nocturnes), ou cognitifs (dépression, anxiété) sont également observés. Enfin, des troubles respiratoires surviennent fréquemment et représentent la première cause de mortalité pour les patients atteints d'AMS.

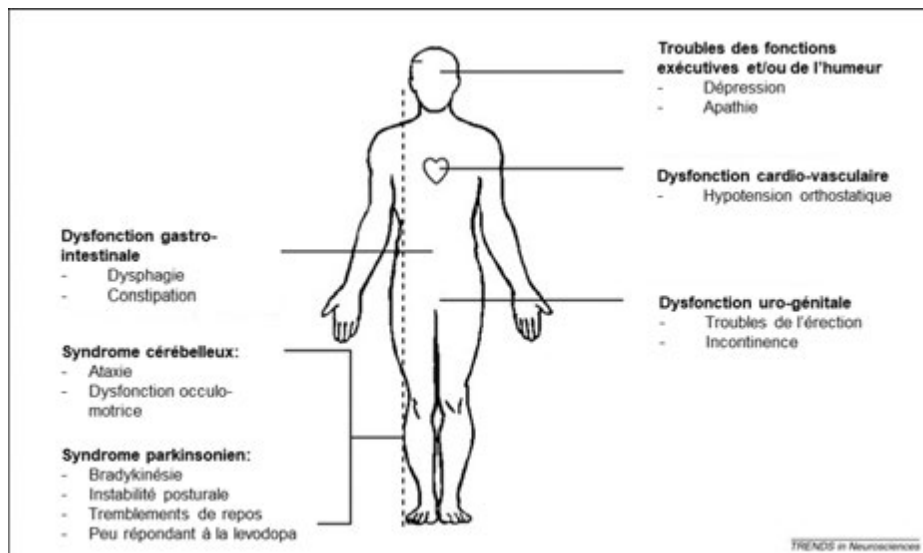


Figure 3 : Illustration des symptômes moteurs et non-moteurs pouvant être présents chez les patients atteints d'atrophie multisystématisée. Adapté de (Ubhi *et al.*, Trends in Neurosciences, 2011)

Anatomo-pathologie

Les synucléinopathies sont caractérisées au niveau anatomo-pathologique par : (i) une **neurodégénérescence** et (ii) la présence **d'inclusions intracytoplasmiques positives pour l' α -syn** au sein du système nerveux central.

L'étude post-mortem de cerveaux provenant de patients parkinsoniens met en évidence une déplétion dopaminergique au niveau du striatum, due à une perte neuronale des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNpc) qui projettent vers le striatum. Au niveau macroscopique, cette neurodégénérescence nigrale est visible par la disparition de la zone noire qui correspond à la dépigmentation de la mélanine contenue dans le cytoplasme des neurones dopaminergiques de la SNpc (**McCann *et al.*, Parkinsonism & Related Disorders, 2014**) (**Figure 4A-B**). Les symptômes moteurs observés chez les patients parkinsoniens sont expliqués par cette perte d'innervation striatale. Outre le système dopaminergique, les autres systèmes monoaminergiques tels que les systèmes noradrénergiques, sérotoninergiques et cholinergiques sont également affectés. Associée à cette neurodégénérescence de la voie nigro-striée, la présence d'inclusions intracytoplasmiques positives pour l' α -syn et pour l'ubiquitine dans les neurones, appelés corps de Lewy (*Lewy Bodies* - LB), est la seconde caractéristique de la MP (**Spillantini *et al.*, Nature, 1997**) (**Figure 4C**). Ces inclusions peuvent également être présentes au niveau des prolongement neuronaux et sont alors appelées corps de Neurites (*Lewy Neurites* – LN).

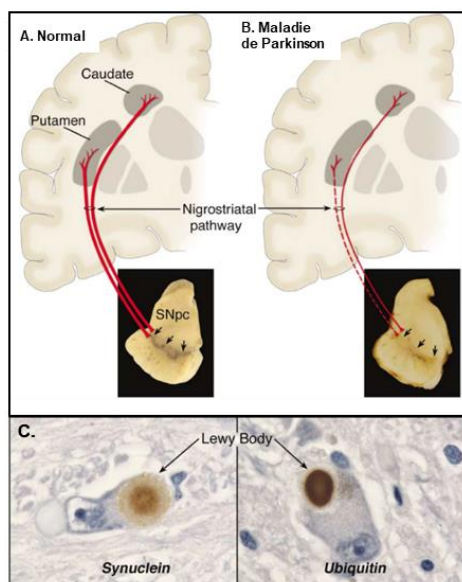


Figure 4 : Caractéristiques neuro-anatomopathologiques de la maladie de Parkinson.

A-B. Une perte des neurones dopaminergiques est observée dans la substance noire pars compacta, induisant une perte d'innervation dopaminergique au niveau du striatum.

C. Présence d'inclusions intracytoplasmiques positives pour l' α -synucléine et pour l'ubiquitine, appelées corps de Lewy ou Lewy Body (LB).

D'après (Dauer & Przedborski, *Neuron*, 2003)

En 2002, Braak et collaborateurs ont décrit la progression de cette synucléinopathie au sein du système nerveux central en différents stades, émettant l'hypothèse que la progression de la synucléinopathie est en cohérence avec la progression de la pathologie (Braak H, *Neurobiology of Aging*, 2002) (Figure 5, Table 2a). Cette hypothèse reste toujours controversée car elle s'appuie seulement sur la propagation des zones affectées par la présence des LB et non liée aux processus de neurodégénérescence.

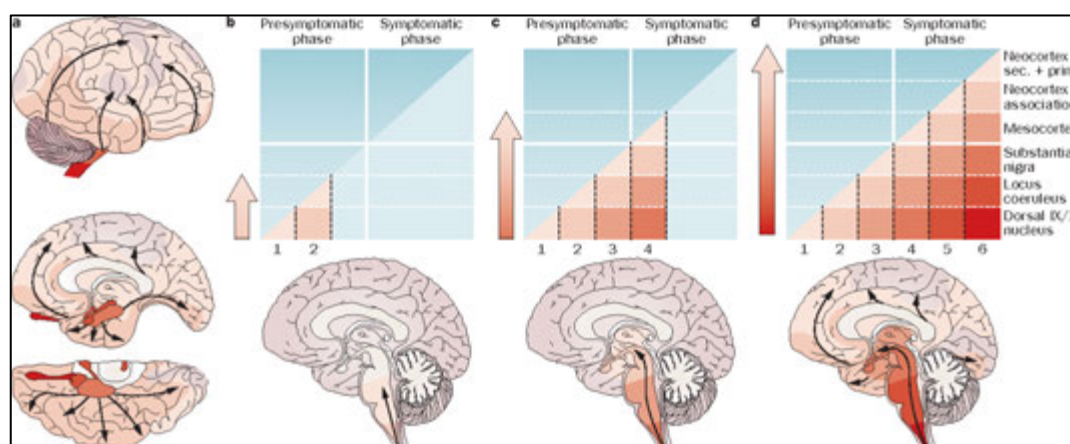


Figure 5 : Stades de propagation de la pathologie de la MP selon l'hypothèse de Braak. Les différents stades de propagation sont détaillés dans la Table 2a (page 36). Adapté de (Braak H, *Neurobiology of Aging*, 2002)

La neuropathologie associée à la DLB recoupe les caractéristiques de la MP avec une dégénérescence nigro-striée et la présence de LB et de LN dans le système nerveux central. Cependant, elle se distingue surtout de la MP par la présence de dépôts de plaques amyloïdes au niveau cortical (McKeith *et al.*, *Neurology*, 2017).

Selon le phénotype clinique des patients atteints d'AMS, la neuropathologie associée affecte de multiples aires cérébrales. Les cerveaux de patients atteints d'AMS présentent au niveau macroscopique une atrophie touchant la substance blanche et grise de différentes régions. Les patients atteints d'AMS-parkinsonien présentent une neurodégénérescence au niveau de la voie nigro-striée, telle qu'observée pour la MP, expliquant la prépondérance des symptômes moteurs parkinsoniens au niveau clinique. Les patients atteints d'AMS-cérébelleux présentent une neurodégénérescence au niveau du système olivo-ponto-cérébelleux. Différents noyaux autonomes sont également affectés par une dégénérescence, à l'origine des symptômes dysautonomiques caractéristiques de l'AMS. (Jellinger, *J Alzheimers Dis*, 2018) (Figure 6)

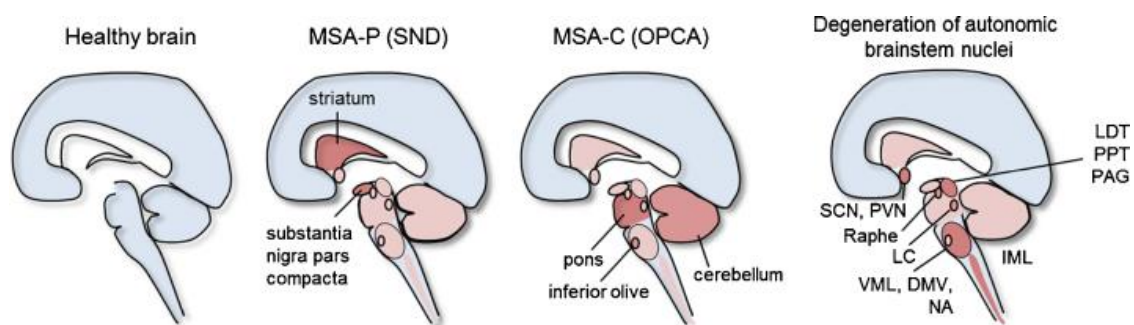


Figure 6 : Zones atteintes par une neurodégénérescence selon le phénotype clinique du patient atteint d'AMS. D'après (Kuzdas-Wood *et al.*, *Progress in neurobiology*, 2014)

Contrairement à la MP, les inclusions positives pour l' α -syn caractérisant cette seconde synucléinopathie sont localisées dans le cytoplasme des oligodendrocytes et appelées Inclusions Cytoplasmiques Gliales (*Glial Cytoplasmic Inclusions* - GCI) (Figure 7). Elles sont très rarement localisées au niveau des neurones. Ces GCI sont largement distribuées dans différentes régions du système nerveux central selon trois stades de propagation propres à chaque phénotype clinique et proposés par Kurt Jellinger et collègues en 2005 (Jellinger *et al.*, *Movement Disorders*, 2005) (Figure 8, Table 2b).

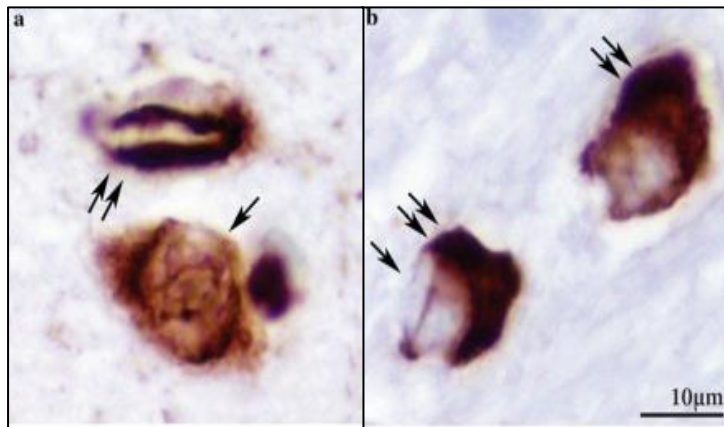


Figure 7 : Les inclusions cytoplasmiques gliales de l'AMS. Les inclusions intracytoplasmiques positives pour l' α -synucléine sont présentes dans les oligodendrocytes. D'après (Halliday *et al.*, *Acta Neuropathologica*, 2011)

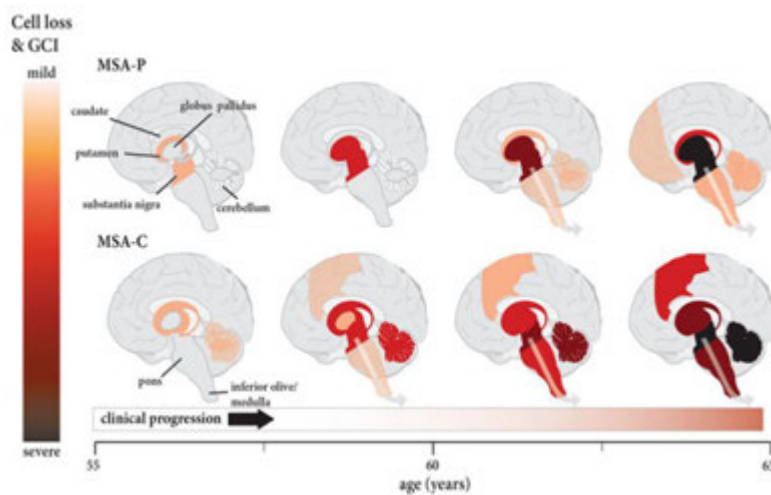


Figure 8 : Stades de propagation de la pathologie de l'AMS selon le phénotype clinique du patient. Les différents stades de propagation sont décrits dans la Table 2b (Page 36). D'après (Halliday *et al.*, *Acta Neuropathologica*, 2011)

Les oligodendrocytes sont les cellules productrices de la myéline qui, par enroulement de prolongement membranaire d'un oligodendrocyte autour d'un même axone, viennent protéger les projections axonales des neurones. La gaine de myéline vient préserver l'intégrité axonale mais également isoler électriquement des portions d'axones, excepté au niveau de zones nues dites nœud de Ranvier, permettant la diffusion rapide de courant nerveux. Dans les patients atteints d'AMS, une perte de myélinisation est observée dans les zones affectées par la neurodégénérescence, notamment dans 50% des cas d'AMS-c (Ishizawa *et al.*, *Neuropathology*, 2008, Papp *et al.*, *Journal of the Neurological Sciences*, 1989). De plus, une relocalisation des protéines constituant la myéline telle que la protéine basique de la myéline (*Myelin Basic Protein* - MBP) et la protéine p25 α est observée, parfois avant l'apparition des GCI (Matsuo *et al.*, *The American journal of pathology*, 1998, Ota *et al.*, *Acta neuropathologica communications*, 2014, Song *et al.*, *The American journal of pathology*, 2007). Enfin, des phénomènes d'astroglie et de microglie sont également observés dans les zones cérébrales affectées par la

perte neuronale (Shy & Drager, JAMA Neurology, 1960, Watanabe *et al.*, Brain, 2002, Wenning *et al.*, Brain, 1994).

Stades de propagation	Zones du cerveau affectées par la présence d'inclusions
a- Maladie de Parkinson (stades de Braak)	
I	Point d'initiation de la pathologie : medulla oblongata (noyau dorsal moteur du nerf glosso-pharyngien IX et du nerf vague ou pneumogastrique (X)) et zone intermédiaire réticulée
II	Régions du stade I + aire tegmentale du pons (noyaux de Raphé et locus coeruleus)
III	Régions du stade II + régions mésencéphaliques (substance noire <i>pars compacta</i>)
IV	Régions du stade III + premières zones corticales telles que le cortex temporal
V	Régions du stade IV + atteinte du néocortex et du cortex préfrontal
VI	Régions du stade V + aires sensori-motrices
b- Atrophie Multi-Systématisée (stades de Jellinger)	
AMS-p	
I	Lésions confinées au niveau de la substance noire <i>pars compacta</i> et légère atteinte du putamen
II	Atteinte sévère de la substance noire <i>pars compacta</i> et du putamen + légère atteinte du noyau caudé et du noyau externe du globus pallidus
III	Atteinte sévère du striatum avec perte neuronale au niveau du globus pallidus et du caudé
AMS-c	
I	Perte minime des cellules de Purkinje + diminution de la myélinisation dans le cervelet + perte neuronale variable au niveau de la substance noire <i>pars compacta</i>
II	Propagation de la lésion au sein de tout le cervelet
III	Atteinte sévère du cervelet et du pons

Table 2 : Description des différentes zones atteintes par la présence d'inclusions positives pour l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson (a) et dans l'atrophie multisystématisée (b). D'après (Arotçarena & Dehay, Pratique Neurologique FMC, 2018)

Diagnostic

De par leurs manifestations cliniques et marqueurs neuro-anatomo-pathologiques parfois communs, le diagnostic différentiel de ces trois synucléinopathies reste difficile à établir, notamment aux stades précoces du développement de la pathologie. De plus, de par la non-spécificité des symptômes non moteurs que partagent les synucléinopathies avec la population vieillissante non atteinte et l'absence de biomarqueurs robustes, le diagnostic précoce de ces pathologies reste impossible à ce jour. Néanmoins, un consensus utilisant des critères de diagnostic et l'utilisation d'outils de diagnostic a été établi pour discriminer au niveau clinique ces synucléinopathies.

Le diagnostic clinique de la MP se détermine par la présence de la bradykinésie associée à au moins un des trois autres points cardinaux moteurs (rigidité musculaire, instabilité posturale, tremblements de repos) selon les critères de référence de la UK Parkinson's Disease Society Brain Bank. De plus, au moins trois des aspects suivants doivent supporter ce diagnostic : initiation unilatérale de la pathologie, asymétrie persistante en faveur du côté de l'initiation, tremblements de repos asymétriques, réponse excellente à la levodopa, pathologie progressive, dyskinésie apparente, réponse au traitement à la levodopa pendant 5 ans minimum, durée de la pathologie supérieure à 10 ans. Des investigations par imagerie cérébrale peuvent également être utilisées

pour aider au diagnostic avec des approches utilisant l’Imagerie par Résonance Magnétique ou des approches par Tomographie par Emission de Positron utilisant un ligand du transporteur à la dopamine pour visualiser l’extension de la lésion dopaminergique. Aucun biomarqueur n’a aujourd’hui été jugé robuste afin de pouvoir établir de manière plus précoce le diagnostic. (Postuma & Berg, Movement disorders, 2019)

Le diagnostic des DLB est difficilement différentiable de celui de la MP. Le seul critère de différenciation repose donc sur la présence précoce des troubles cognitifs qui apparaissent dès la première année de la pathologie motrice associée à la DLB (McKeith *et al.*, Neurology, 2017).

Concernant l’AMS, le diagnostic a été affiné en 2007 lors d’un second consensus et se détermine selon trois niveaux de certitude : possible, probable et certaine (Gilman *et al.*, Neurology, 2008) (Figure 9). Une AMS possible se définit cliniquement par un syndrome parkinsonien ou cérébelleux, associé à au moins un signe suggéré de dysautonomie ainsi qu’un autre signe clinique valable ou une anomalie en neuro-imagerie. L’AMS dite probable se définit cliniquement par une maladie progressive caractérisée par un syndrome parkinsonien non répondant à un traitement à la levodopa ou un syndrome cérébelleux associé à une dysautonomie caractérisée (dysfonctionnement uro-génital et/ou hypotension orthostatique). Enfin, une AMS est définie comme certaine lors de l’étude post-mortem du cerveau, qui présente une dégénérescence de la voie nigro-striée et/ou du système olivo-ponto-cérébelleux avec une présence abondante de GCI positives pour l’ α -syn.

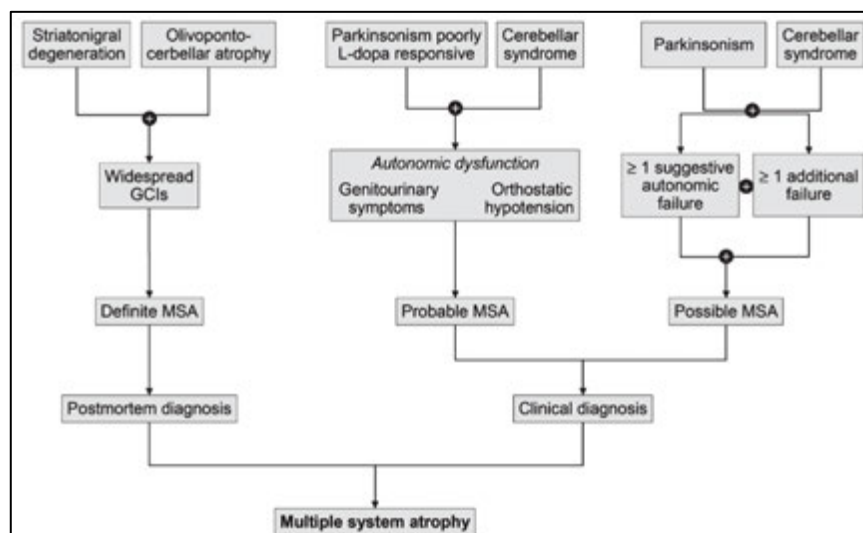


Figure 9 : Critères de diagnostic proposés pour les patients atteints d’AMS. D’après (Jellinger, J Alzheimers Dis, 2018)

Le syndrome parkinsonien présent chez les patients atteints d'AMS est dit atypique car peu, voire aucune, amélioration des symptômes n'est visible après un traitement dopaminergique classique à la levodopa et qu'il se manifeste souvent de manière symétrique. Cette absence ou pauvreté de réponse symptomatique post-traitement s'explique par le fait que le taux de récepteurs dopaminergiques présents dans le striatum décline au cours de la pathologie, contrairement à la MP (**Ahmed *et al.*, Neuropathology and Applied Neurobiology, 2012**). De plus, le diagnostic différentiel de l'AMS par rapport à la MP repose sur la présence d'une dysautonomie avérée, en addition de dysautonomie caractéristique de l'AMS dans des phases avancées de la pathologie telle qu'une déficience respiratoire. L'utilisation de l'imagerie cérébrale peut permettre d'établir le bon diagnostic, pouvant mettre en évidence un hypométabolisme dans la zone striatale ou cérébelleuse. De plus, bien qu'en phase exploratoire, les taux de protéines telles que Tau ou Neurofilament retrouvés dans le liquide céphalo-rachidien semblent être de potentiels biomarqueurs valables afin de discriminer l'AMS de la MP.

Traitements actuels

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour les synucléinopathies. Seuls des traitements symptomatiques moteurs et non moteurs limités sont aujourd'hui proposés aux patients, avec des approches pharmacologiques et/ou chirurgicales.

Le traitement de référence pour les patients atteints de la MP est l'utilisation du précurseur direct de la dopamine que constitue la levodopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), découverte dans les années 1960 (**Birkmayer & Hornykiewicz, Wiener klinische Wochenschrift, 1961, Cotzias *et al.*, The New England Journal of Medicine, 1969**). Ce traitement permet de rétablir les niveaux de dopamine, diminuant ainsi les symptômes moteurs tels que la rigidité musculaire ou la bradykinésie. Cependant, à long terme, ce traitement induit l'apparition d'effets secondaires indésirables que sont les dyskinésies induites par la levodopa (**Cotzias *et al.*, The New England Journal of Medicine, 1969**), diminuant significativement la qualité de vie du patient. Ce traitement s'avère efficace seulement dans 30% des cas d'AMS, et souvent de manière temporaire (1-3 ans) (**Jellinger, J Alzheimers Dis, 2018**). Des agonistes dopaminergiques peuvent également être utilisés comme traitement (**Schapira *et al.*, The Lancet, 2014**), tels que la Rasagiline mais présentent des effets secondaires psychotiques importants tels que des hallucinations ou des troubles du comportement (**Finberg *et al.*, British journal of pharmacology, 1981, Kalir *et al.*, British journal of pharmacology, 1981, Youdim *et al.*, Annals of the New York Academy of Sciences, 2001**).

Concernant la MP, lorsque le traitement à la levodopa s'avère moins efficace ou devient handicapant par l'apparition des dyskinésies (40-50% des cas), une approche chirurgicale est proposée lorsque cela est envisageable (**Bronstein et al., Archives of neurology, 2011**). Il s'agit de la stimulation cérébrale profonde ou Deep Brain Stimulation (DBS) acceptée depuis 2002 comme traitement pour les cas idiopathiques de la MP, et qui consiste à implanter des électrodes de stimulation au niveau du noyau subthalamique (**Benazzouz et al., european Journal of Neuroscience, 1993, Limousin et al., The New England Journal of Medicine, 1998**) ou du globus pallidus interne (**Rodriguez-Oroz et al., Brain, 2005**). Cette chirurgie n'est envisagée que pour certains patients présentant le profil du bon candidat comprenant : une réponse adéquate préalable au traitement dopaminergique, la présence de dyskinésies, des tremblements résistants aux traitements pharmacologiques et peu de déficit cognitif. Plusieurs cas reportés de patients diagnostiqués avec une MP idiopathique, finalement diagnostiqués comme patients AMS en post-mortem, ont montré une réponse initiale positive à la DBS avant un déclin secondaire et une progression rapide de la pathologie, questionnant ici l'utilisation de ce traitement chirurgicale dans le cas de l'AMS (**Thavanesan et al., Case Rep Neurol, 2014**).

En parallèle de traitements symptomatiques moteurs, différents traitements pharmacologiques ou alternatifs sont proposés aux patients pour réduire les symptômes non moteurs ou dysautonomiques.

II. La protéine α -synucléine : l'hypothèse « prion-like »

Comme décrit précédemment, la présence d'inclusions intracytoplasmiques positives pour la protéine α -synucléine est le dénominateur commun aux synucléinopathies, en plus de l'aspect neurodégénératif. Ces inclusions sont présentes dans différents types cellulaires du système nerveux : dans les neurones formant les LB dans la MP et la DLB, et dans les cellules oligodendrogiales formant les GCI dans l'AMS.

L' α -synucléine physiologique

L' α -synucléine (α -syn) est une protéine de 140 acides aminés codée par le gène *SNCA* chez l'Homme. Elle a été découverte en 1985 par un anticorps lors du marquage de vésicules synaptiques cholinergiques chez la raie électrique *Torpedo californica* (**Carlson & Kelly, The Journal of cell biology, 1980, Maroteaux et al., The Journal of Neuroscience, 1988**). Un homologue de cette protéine a été identifié dans la même étude dans le cerveau du rat (**Maroteaux**

et al., **The Journal of Neuroscience**, 1988). Elle a été alors nommée « synucléine » par sa localisation à la fois cytoplasmique et nucléaire. Plus tard, un homologue de cette même protéine est identifié au niveau des plaques amyloïdes chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (**Uéda et al.**, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1993). L' α -syn a ensuite été découverte chez l'Homme et séquencée à partir de tissu cérébral (**Jakes et al.**, **FEBS Letters**, 1994). Les deux autres isoformes de la même famille, la β -synucléine et la γ -synucléine, ont été également identifiés.

La séquence de la protéine α -syn est divisée en trois grands domaines (**Figure 10A-B**) :

- ❖ Le domaine N-terminal (acides aminés 1-60), très conservé phylogénétiquement, composé de 11 motifs de répétition hexamériques KTKEGV et formant des hélices α qui permettent la liaison aux lipides ;
- ❖ Le domaine central ou core (acides aminés 61-95), composé du domaine non-amyloïde NAC (non-A β Component of amyloid plaque) et responsable des propriétés agrégatives de la protéine par sa capacité à former des structures en feuillets β (**Giasson et al.**, **J Biol Chem**, 2001);
- ❖ Le domaine C-terminal (acides aminés 96-140), chargé négativement, contient notamment le site de phosphorylation supposé pathogénique au niveau de la sérine 129.

Il a été montré que l' α -syn se lie préférentiellement aux lipides membranaires, formant alors une structure en hélice α grâce aux résidus lysine contenus dans les motifs de répétition au niveau du domaine N-terminal (**Figure 10C**) (**Wang et al.**, **Protein science : a publication of the Protein Society**, 2010). Lorsqu'elle n'est pas liée aux membranes, l' α -syn forme un monomère déplié, ou un tétramère stable notamment dans le cytosol des cellules de neuroblastome M17 ou des érythrocytes humains (**Bartels et al.**, **Nature**, 2011, **Gould et al.**, **The Journal of biological chemistry**, 2014). Il semblerait qu'il y ait un équilibre dynamique entre ces deux structures au sein de la cellule.

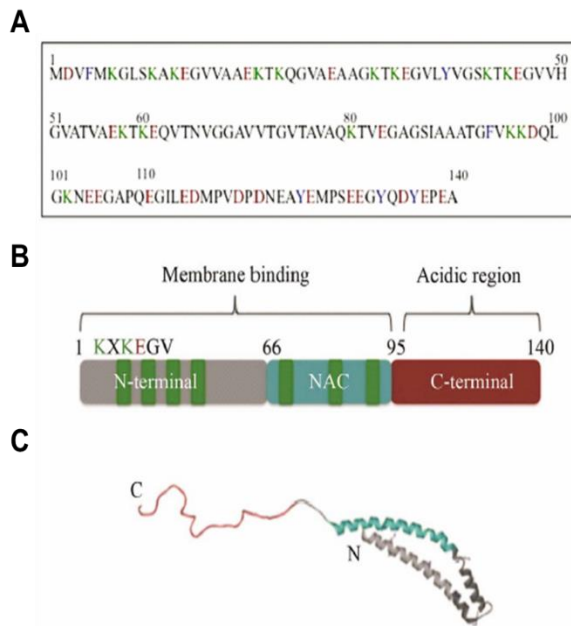


Figure 10 : Séquence primaire et structure de la protéine α -synucléine. **A.** Structure primaire de la protéine α -synucléine. Bleu : résidus aromatiques, Rouge : résidus acides, Vert : lysines. **B.** Représentation schématique des trois domaines de l' α -synucléine. **C.** Représentation de la structure de l' α -synucléine liée à la membrane. Gris : région N-terminale en double hélices α ; Bleu : région NAC centrale ; Rouge : région C-terminale en « random coil » D'après (Gonzalez-Horta *et al.*, *Open Journal of Biophysics*, 2013)

Cette protéine est exprimée dans le système nerveux central et périphérique (au niveau du système nerveux entérique, par exemple) mais également au niveau des terminaisons nerveuses. Elle est également présente dans des structures non nerveuses, telles que dans les globules rouges du sang (Barbour *et al.*, *Neurodegenerative Diseases*, 2008).

Elle peut subir différentes modifications post-traductionnelles dont les conséquences fonctionnelles et pathologiques sont encore peu comprises bien qu'elles soient retrouvées au sein des inclusions cytoplasmiques. La plus décrite demeure la phosphorylation à la sérine 129, suggérée comme ayant une conséquence fonctionnelle toxique bien que cela reste à ce jour encore débattue (Fujiwara *et al.*, *Nature Cell Biology*, 2002). D'autres modifications telles que la troncation au niveau de la région C-terminal par les cathepsines à cystéine lysosomales (Figure 11), la phosphorylation de la sérine 87 ou encore la nitration des tyrosines 125 ou 133 ont également été décrites chez les patients (Giasson *et al.*, *Science*, 2000, Kellie *et al.*, *Scientific reports*, 2014).

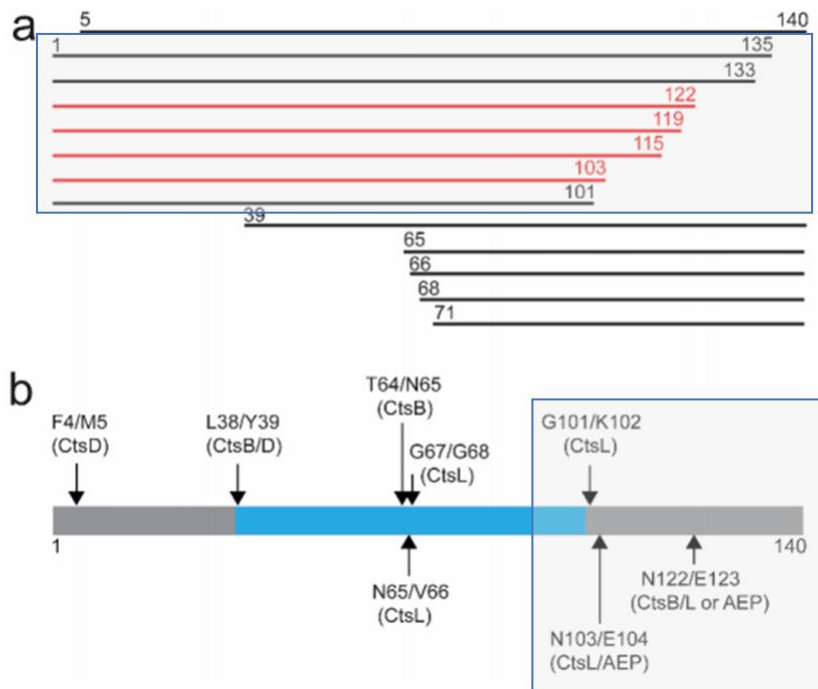


Figure 11 : La troncation de la partie C-terminale de l' α -synucléine retrouvée chez les patients parkinsoniens. (a) Les troncations de l' α -synucléine au niveau du C-terminal sont représentées dans l'encadré gris. Sept troncations de la partie C-terminale sont retrouvées chez les patients parkinsoniens dont quatre (en rouge) retrouvées dans différentes études indépendantes. **(b)** L'activité des cathepsines à cystéine lysosomales sont à l'origine des troncations au niveau du C-terminal de la protéine. CtsL : Cathepsine L, CtsB : Cathepsine B, AEP : endopeptidase asparagine. D'après (**McGlinchey *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2019**)

Bien que son rôle physiologique ne soit pas totalement élucidé, plusieurs pistes de recherche ont rapporté des actions pléiotropes de l' α -syn au niveau cellulaire.

Le premier rôle suggéré de l' α -syn concerne l'exocytose des neurotransmetteurs, par sa localisation au niveau du compartiment pré-synaptique. A ce niveau, elle interagit avec le complexe SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) Attachment protein Receptor) et les membranes pré-synaptiques afin de maintenir l'intégrité et l'amarrage du complexe SNARE, facilitant la libération des neurotransmetteurs au niveau de la synapse (**Burré *et al.*, Science, 2010**). La partie C-terminale de la protéine α -syn montre une homologie avec les protéines chaperonnes et notamment avec les protéines 14-3-3 qui interviennent dans différents processus cellulaires (**Park *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2002**). Elle peut ainsi réguler l'activité des ligands des protéines chaperonnes 14-3-3, notamment la voie Ras (**Ostremova *et al.*, The Journal of Neuroscience, 1999**). Il a été montré que l' α -syn active la protéine Ras, qui active alors une cascade d'évènements via la voie ERK/MAPK, impliquée dans la différenciation neuronale. Un rôle dans le développement et la maturation des oligodendrocytes a également été suggéré (**Djelloul *et al.*, Stem cell reports, 2015**).

L' α -syn interagit également avec l'homéostasie cellulaire au niveau du cerveau. En effet, elle semble être impliquée dans la présentation des substrats à l'enzyme Acetyl-coA synthétase, afin de produire des acides gras poly-insaturés essentiels au bon fonctionnement cérébral (**Ruipérez *et al.*, Progress in Lipid Research, 2010**). De plus, elle semble jouer un rôle dans l'homéostasie glucidique en régulant les niveaux de glucose au niveau des tissus adipeux (**Rodriguez-Araujo *et al.*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2013**) et la réponse à l'insuline (**Geng *et al.*, American journal of physiology Endocrinology and metabolism, 2011**). Au niveau des terminaisons dopaminergiques, elle régule le métabolisme de la dopamine en réduisant l'activité de la tyrosine hydroxylase indirectement via l'activation de la protéine phosphatase 2A (**Peng *et al.*, Journal of Cell Science, 2005**). Elle module une gamme importante de processus cellulaires par activation de la protéine Calmoduline, impliquée dans différentes voies de signalisation cellulaires via l'activation de kinase spécifique ciblant les récepteurs couplés aux protéines G (**Martinez *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2003**).

Enfin, des études suggèrent un effet neuroprotecteur par différentes actions. Il a été démontré notamment qu'elle inhibe les processus apoptotiques en réduisant l'activité de la protéine kinase C au sein des neurones dopaminergiques (**Jin *et al.*, The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2011**). De manière plus générale, l' α -syn démontre d'une action antioxydante lorsqu'elle se lie aux lipides membranaires, les protégeant ainsi d'une toxicité oxydante cellulaire dans les neurones dopaminergiques (**Zhu *et al.*, Biochemistry, 2006**). Ainsi, l' α -syn est impliquée dans différents processus cellulaires démontrant d'actions pléiotropes dont certaines demeurent à ce jour inconnues.

Une perte d'expression de la protéine α -syn n'a que peu d'effet délétère mais une accumulation et agrégation de cette protéine sont à l'origine du phénotype présent dans les synucléinopathies (**El-Agnaf *et al.*, FEBS Letters, 1998, Periquet *et al.*, The Journal of Neuroscience, 2007**).

L'hypothèse « prion-like » de l' α -synucléine pathogénique

a. La protéine prion

Avant de discuter de l'hypothèse dite « prion-like » concernant la protéine α -syn au sein des synucléinopathies, il est nécessaire de repositionner le contexte des maladies à prions et des caractéristiques établies pour la protéine pathogène prion.

Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives infectieuses appelées également encéphalopathies spongiformes transmissibles. Parmi ces maladies, on retrouve la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'Homme, la tremblante chez les ovins ou encore l'encéphalopathie spongiforme bovine ou « vache folle » chez les bovins. En 1982, Prusiner et Colby découvrent l'entité protéique responsable de la pathologie, appelée Protéine PRion Cytoplasmique (PrP_C), exprimée de manière ubiquitaire chez l'Homme (**Prusiner, Science, 1982**). Lorsque l'individu est infecté, elle adopte une conformation pathologique riche en feuillets β et est alors appelée PrP^{sc} scrapie (PrP^{sc}). Cette agrégation se poursuit vers une forme dite amyloïde et est à l'origine de la vacuolisation des neurones avec un aspect spongiforme du tissu amenant à la mort cellulaire. Cette protéine pathologique adopte également des propriétés de propagation, infectant alors de nouvelles cellules en transmettant l'information pathogénique à la protéine saine de la nouvelle cellule hôte infectée par un phénomène d'autoréplication et de transconformation. La protéine prion peut également être transmise d'un individu à l'autre comme cela a été le cas lors de contamination de nouveaux individus par des injections d'hormones de croissance provenant d'hypophyse de patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. La protéine prion peut même passer la barrière inter-espèce comme l'a démontré l'épidémie de la « vache folle » dans les années 1960 après transmission à l'Homme de la protéine pathogène par ingestion de viandes bovines contaminées. (**Colby & Prusiner, Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011**)

Ainsi, les protéines sont définies comme **prions** par quatre caractéristiques :

- ❖ Le **changement conformationnelle** de la protéine physiologique vers sa forme pathogénique adoptant une structure amyloïde riche en feuillets β , capable de s'agréger ;
- ❖ La **propagation** inter-cellulaire, infectant de nouvelles cellules et de nouvelles structures (« spreading ») ;
- ❖ La **transmission de l'information pathogénique** à la forme physiologique de la cellule hôte infectée par un phénomène de transconformation (« seeding ») ;
- ❖ La **transmission inter-individuelle** au sein d'une même espèce, ou même inter-espèce (« infectiosity »).

b. L'agrégation de l' α -synucléine

Au sein des synucléinopathies, les inclusions caractéristiques de ces maladies neurodégénératives, les LB ou les GCI, sont composées en majorité par la protéine α -syn sous une/des forme(s) agrégée(s). Il a été démontré qu'en solution *in vitro*, l' α -syn recombinante possède la capacité

naturelle à s'agréger notamment grâce à son noyau central hydrophobe au sein de sa séquence (**Giasson *et al.*, J Biol Chem, 2001**). A partir de sa forme monomérique dépliée en solution, elle adopte ainsi différentes conformations intermédiaires décrivant le phénomène agrégatif (**Figure 12**). Une nucléation est suggérée comme première étape de l'agrégation de l' α -syn permettant la formation de dimères, de tétramères puis d'oligomères. Le processus agrégatif se poursuit par l'assemblage d'oligomères sous forme de protofibres qui polymérisent par la suite en fibres. Les fibres représentent l'ultime entité thermodynamiquement stable produite par le phénomène agrégatif et sont constituées de feuillets β , leur conférant une structure amyloïde. Des phénomènes de fragmentation des oligomères ou des fibres et de seconde nucléation participent également à la dynamique agrégative de la protéine α -syn.

Au sein des LB et des GCI, l' α -syn est donc présente sous forme de fibres amyloïdes thermodynamiquement stables et riches en feuillet β , ce qui en fait une première caractéristique commune avec la protéine prion.

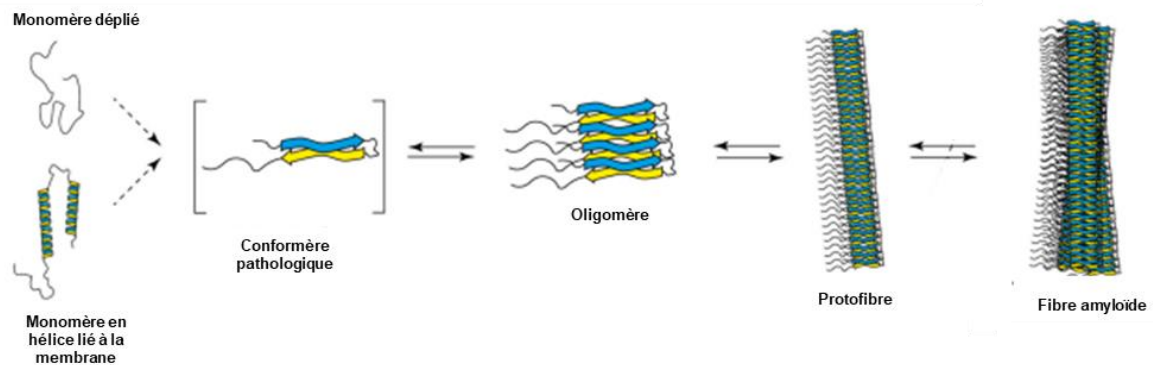


Figure 12 : Processus agrégatif de la protéine α -synucléine. D'après (**Dehay *et al.*, The Lancet Neurology, 2015**).

c. La propagation de l' α -synucléine

Différentes preuves cliniques post-mortem suggèrent que l' α -syn possède la capacité de se propager de cellule à cellule et à travers les différentes structures du système nerveux central, mais également vers les systèmes périphériques.

Comme évoqué précédemment, l'étude post-mortem de cerveaux de patients parkinsoniens par Braak et ses collaborateurs suggère une propagation de la protéine au sein du système nerveux (**Braak H, Neurobiology of Aging, 2002**). Cette étude a mis en évidence une expansion topologique de la synucléinopathie dont le point d'origine estimé se situe au niveau du noyau dorsal moteur IX et X. Ils décrivent ici une propagation caudo-rostrale de la synucléinopathie dans la MP selon cinq stades de propagation (**Table 2.a – Page 36**). Trois stades de propagation de la

synucléinopathie ont également été suggérés pour l'AMS par Kurt Jellinger (**Jellinger et al., Movement Disorders, 2005**), comme rapporté dans la première partie de l'introduction (**Table 2.b – Page 36**). Expérimentalement, après injection de fibres préformées d' α -syn synthétiques au niveau du striatum dorsal de souris sauvages, une propagation aux régions interconnectées a été observée par la présence d'inclusions positives pour l' α -syn atteignant la SNpc, et entraînant une neurodégénérescence de l'ordre de 30% et des déficits moteurs (**Luk et al., Science, 2012**). Le choix du matériel synthétique soulève la question de la présence de ces entités dans les conditions pathologiques observées chez les patients atteints de synucléinopathies. Recasens et collaborateurs, par l'injection de fractions de LB provenant de mésencéphales de cerveaux parkinsoniens au niveau de la SNpc de souris sauvages ont pu répondre à cette problématique (**Recasens et al., Ann Neurol, 2014**). Ils ont également fait la démonstration d'une propagation de l' α -syn dans les zones interconnectées à la région d'injection par l'expansion de la présence d' α -syn résistante à la protéinase K dans ces différentes régions. Après avoir injecté ces mêmes fractions soit dans le striatum ou la SNpc de deux singes, une propagation liée à l' α -syn a pu également être observée aux différentes régions interconnectées, amenant une nouvelle preuve de concept d'une propagation inter-régionale de l' α -syn dans les modèles de synucléinopathies. Le mode de propagation de la protéine permettant l'atteinte de différentes régions connectées du système nerveux n'a pas été encore élucidé. Il pourrait s'agir d'une propagation indirecte via des messagers cellulaires sécrétés ou des facteurs de stress exogènes, ou bien d'une transmission directe de cellule à cellule s'amplifiant sur de très longues distances.

En parallèle, à la fin des années 2000, la première mise en évidence d'une propagation de la protéine α -syn de cellule à cellule a été apportée chez des patients parkinsoniens ayant reçu une greffe ectopique de neurones dopaminergiques embryonnaires au niveau du striatum, pour tenter de compenser leur déficit en dopamine. Trois cas de patients ayant survécu plus de dix ans à la transplantation ont été reportés. Pour ces patients, l'étude post-mortem a mis en lumière la présence de LB dans les neurones greffés, suggérant une propagation cellule à cellule de l' α -syn des neurone hôtes aux neurones greffés (**Kordower et al., Nat Med, 2008, Li et al., Nat Med, 2008, Mendez et al., Nature Medicine, 2008**). Ces découvertes cliniques ont par la suite été corroborées par de nombreuses preuves expérimentales. Dès 2009, Desplats et collaborateurs ont démontré le transfert de l' α -syn d'une cellule émettrice à une cellule hôte dans des systèmes *in vitro* et *in vivo* (**Desplats et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2009**). Par l'utilisation de co-culture de cellules de neuroblastomes humains, ils ont démontré que l' α -syn marquée dans les cellules donneuses se retrouvait au niveau des cellules receveuses, suggérant une propagation cellule à

cellule. Dans cette même étude, après transplantation de cellules souches neuronales murines dans l'hippocampe de souris transgéniques surexprimant l' α -syn humaine, des corps d'inclusion positifs pour l' α -syn humaine ont été observés dans 15% des neurones greffés, suggérant le passage de la protéine de la cellule hôte à la cellule transplantée. Ces résultats ont été également confirmés par une autre équipe après transplantation de cellules embryonnaires de mésencéphale de rat dans le striatum de rats préalablement lésés à la 6-OHDA puis exprimant l' α -syn humaine par injection virale, qui était par la suite retrouvée dans les neurones transplantés (**Kordower *et al.*, Neurobiol Dis, 2011**).

Le mode de propagation de cellule à cellule reste à ce jour débattue. L' α -syn peut être transmise de neurones à neurones (**Desplats *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, Luk *et al.*, Science, 2012**), des neurones aux astrocytes (**Cavaliere *et al.*, Neurobiology of Disease, 2017, Lee *et al.*, The Journal of biological chemistry, 2010**) et oligodendrocytes (**Reyes *et al.*, Glia, 2014**) et des oligodendrocytes aux astrocytes (**Valera *et al.*, Glia, 2014**). La voie de sécrétion classique étant écartée par l'absence de séquence d'adressage au réticulum endoplasmique sur la séquence de l' α -syn, des voies alternatives comprenant la formation de nanotube ou la voie exosomale sont envisagées (**Bieri *et al.*, Neurobiol Dis, 2017, Soria *et al.*, Front Neurosci, 2017**) (**Figure 13**). L'entrée de l' α -syn dans la cellule hôte semble être classique via l'endocytose ou la diffusion passive.

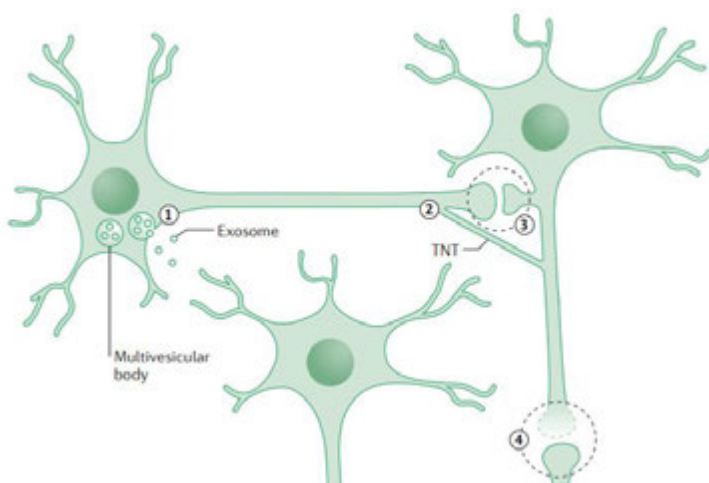


Figure 13 : Mécanismes possibles pour le transfert cellule à cellule de l' α -synucléine. (1) via les exosomes. (2) via la formation de nanotubes. (3) via la libération et l'absorption au niveau de la synapse. (4) via la libération après un défaut cellulaire ou synaptique. D'après (**Walsh & Selkoe, Nature Reviews Neuroscience, 2016**).

Enfin, une origine périphérique entérique de la MP a été proposée par Braak et collaborateurs, qui ont mis en évidence pour la première fois en 2006 la présence d'inclusion intra-neuronales positives pour l' α -syn au niveau du plexus myentérique et sous-muqueux gastrique chez cinq individus (**Braak *et al.*, Neurosci Lett, 2006**) (**Figure 14**).

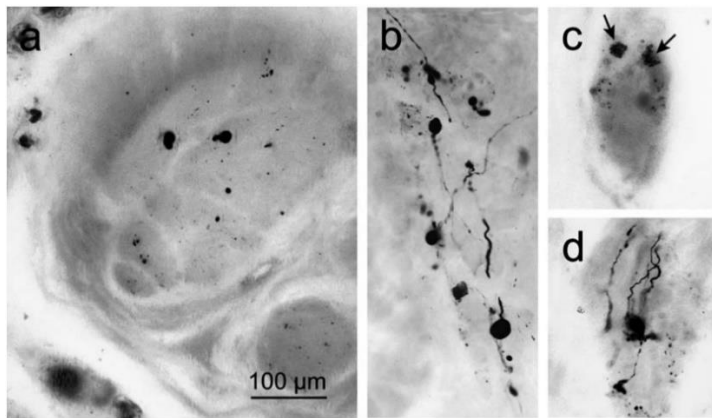


Figure 14 : Images illustratives des inclusions cytoplasmiques positives pour l' α -synucléine retrouvées dans la paroi gastrique des individus parkinsoniens. D'après (Braak *et al.*, *Neurosci Lett*, 2006).

Ils suggèrent ainsi pour la première fois une transmission de la protéine α -syn du système nerveux entérique vers le système nerveux central, potentiellement via le nerf vague. Le fait que les symptômes de dysautonomie gastro-intestinale apparaissent précocement chez les patients parkinsoniens contribue à l'hypothèse d'une origine entérique de la MP. Plus récemment, des gastroscopies réalisées chez des patients parkinsoniens, des patients pré-symptomatiques et des individus sains ont montré la présence de fibres positives pour l' α -syn de manière plus fréquente chez les patients parkinsoniens (60,7% versus 16,7% pour les patients pré-symptomatiques et 4,3% chez les sujets sains) (Sanchez-Ferro *et al.*, *Mov Disord*, 2015). Enfin, bien que parfois controversées, des études épidémiologiques ont suggéré qu'une vagotomie diminuait significativement le risque de développer la MP (Liu, *Neurology*, 2017, Svensson *et al.*, *Annals of Neurology*, 2015). De même, une étude épidémiologique récente sur une cohorte de 1,6 millions d'individus a démontré qu'une appendicectomie diminuerait significativement le risque de développer la MP ou retarderait l'apparition de la pathologie, suggérant l'appendice comme lieu d'initiation de la pathologie (Killinger *et al.*, *Science Translational Medicine*, 2018).

L'hypothèse d'une transmission périphérique a également été étudiée dans des modèles expérimentaux de synucléinopathies. Dans un modèle rat de la MP, ayant reçu une injection virale exprimant l' α -syn humaine au niveau dorsal de la SNpc, des marquages positifs pour l' α -syn ont été observés dans les zones postérieures telles que la medulla oblongata mais également au niveau de sections du nerf vague et des parois de l'estomac. Ces résultats suggèrent une propagation rétrograde de l' α -syn du système nerveux central vers le système nerveux entérique périphérique, via le nerf vague (Ulusoy *et al.*, *Acta Neuropathol*, 2017). Cette même équipe a également démontré une potentielle route de propagation antérograde de l' α -syn de la périphérie vers le système nerveux central après injection du même virus au niveau du nerf vague gauche et observation de marquage positif pour l' α -syn humaine dans des régions interconnectées plus rostrales telles que la medulla oblongata ou le mésencéphale (Ulusoy *et al.*, *EMBO Mol Med*, 2013).

Ainsi, des preuves cliniques et expérimentales démontrent d'une propagation de l' α -syn de cellule à cellule, inter-régionale et même périphérique, démontrant d'une deuxième caractéristique commune avec la protéine prion. De futures études sont nécessaires pour déterminer les mécanismes de propagation de la protéine α -syn.

d. La transmission de l'information pathogénique de l' α -synucléine

Plusieurs preuves expérimentales suggèrent que l' α -syn pathogénique est capable de transmettre l'information pathogénique à une protéine α -syn naïve d'une cellule nouvellement infectée.

L'idée d'une induction de la pathogénicité à la protéine endogène a été amenée pour la première fois par l'équipe de Thierry Baron (**Mougenot *et al.*, Neurobiology of Aging, 2012**). Dans leur étude, des jeunes souris transgéniques âgées de 7-9 semaines exprimant l' α -syn humaine mutée en A53T (TgM83) reçoivent une injection intracérébrale d'homogénats de cerveaux provenant de vieilles souris TgM83 âgées de 12-18 mois. Le temps de vie des animaux est alors plus court, l'apparition des symptômes moteurs plus rapides et associée à la présence précoce d' α -syn aux caractéristiques pathogéniques (insoluble et phosphorylée en sérine 129), démontrant d'une accélération de la pathologie liée à l' α -syn induite par l'ajout d' α -syn pathogénique exogène.

La preuve d'un recrutement de la protéine endogène par l' α -syn exogène a été amenée par une autre équipe la même année sur des cultures primaires de neurones hippocampiques murins (**Volpicelli-Daley *et al.*, Neuron, 2011**). Dans cette étude, l'ajout de fibres préformées synthétiques d' α -syn humaine à la culture neuronale entraîne l'internalisation de ces fibres pathogéniques par les neurones avant la formation d'inclusions cytoplasmiques de type LB, positifs pour l' α -syn endogène murine (α -syn phosphorylée en sérine 129, insolubilité, positive pour l'ubiquitine). Ce résultat suggère une induction de la pathogénicité contenue dans l' α -syn humaine synthétique à l' α -syn endogène murine qui adopte à son tour un comportement pathologique. Cette étude a été corroborée *in vivo* par l'injection de fibres préformées synthétiques d' α -syn humaine dans le striatum de souris sauvages (**Luk *et al.*, Science, 2012**). La formation de corps d'inclusions de type LB et LN positifs pour l' α -syn murine suggère que l' α -syn endogène murine adopte un phénotype pathologique en s'agrégant à la suite d'une mise en contact avec l' α -syn humaine pathogénique. Une fois encore, l'utilisation d'un matériel synthétique questionne la viabilité de ce phénomène pour l' α -syn pathogène dans les synucléinopathies.

Ainsi, Recasens et ses collaborateurs, dans leur étude d'injection de fractions LB provenant de mésencéphales de patients parkinsoniens dans la SNpc de souris sauvages, ont également contribué à la preuve d'une transmission d'information pathogénique (**Recasens *et al.*, Ann**

Neurol, 2014). Ils démontrent que : (i) l' α -syn humaine contenue dans les fractions LB n'est plus détectable après 24h post-injection dans le cerveau murin, (ii) une accumulation cytoplasmique d' α -syn endogène murine est observée au sein des neurones dopaminergiques dès 4 mois post-injection, (iii) ce phénomène n'a pas lieu lorsque les fractions LB injectées sont préalablement immunodéplétées en α -syn, et (iv) ce phénomène est absent lorsque les souris sont knock-out pour l' α -syn murine. Ils apportent alors la preuve de concept de l'induction de la pathogénicité de l' α -syn pathogène humaine à l' α -syn endogène murine qui adopte alors une conformation pathologique, suggérant une transmission de l'information pathogénique de l' α -syn.

Des résultats similaires ont été obtenus après injection de fractions insolubles d' α -syn humaine provenant de patients atteints de DLB dans la SNpc de souris sauvages (**Masuda-Suzukake *et al.*, Brain, 2013**), ou d'homogénats de cerveaux provenant de patients atteints d'AMS dans le lobe pariétal droit de souris transgéniques TgM83 (**Watts *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2013**).

En conclusion, ces études expérimentales démontrent d'une transmission de l'information pathogénique contenue dans l' α -syn pathologique à une protéine α -syn naïve dans une cellule nouvellement infectée, amenant une troisième caractéristique commune avec la protéine prion.

Cependant, le mécanisme par lequel cette information est transmise reste à ce jour inconnu, et aucune étude n'a pu démontrer d'une transconformation physique ou fonctionnelle entre une protéine α -syn pathologique et une protéine α -syn naïve.

e. L'absence de transmission inter-individuelle de l' α -synucléine

Contrairement à la protéine prion, le caractère infectieux inter-individuel de l' α -syn n'a jamais pu être démontré. En 2013, une étude post-mortem histochimique a été menée sur 24 patients atteints de maladies neurodégénératives et 10 contrôles sains ayant reçu un traitement hormonal de croissance dérivé d'hypophyses de patients atteints de maladies neurodégénératives (**Irwin *et al.*, JAMA Neurol, 2013**). Aucune transmissibilité inter-individuelle n'a pu être mise en évidence dans cette étude, notamment pour l' α -syn pour les patients atteints de la MP. Aucune étude expérimentale de transmissibilité ou de franchissement de barrière inter-espèce n'a encore été réalisée.

Par cette absence de transmissibilité et de propriété infectieuse inter-individuelle, la protéine α -syn n'est donc pas une protéine prion mais une protéine dite « **prion-like** ». Les synucléinopathies

sont donc des maladies dites « prion-like » en l'état actuel des choses puisque l' α -syn possède quelques caractéristiques communes à la protéine prion (**Figure 15**).

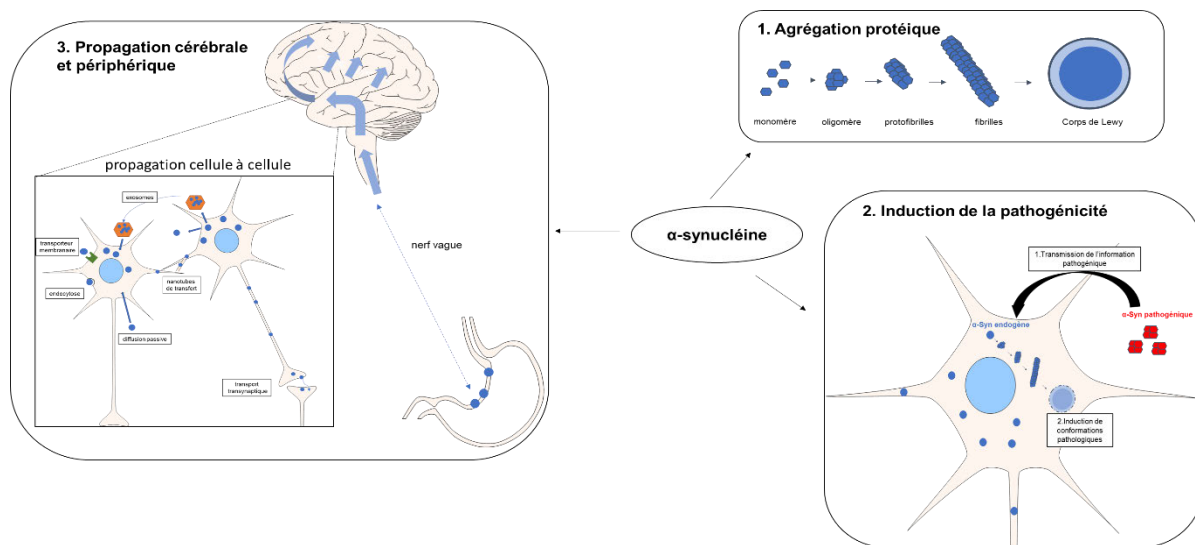


Figure 15 : Propriétés « prion-like » de la protéine α -synucléine. 1. Le changement conformationnel de la protéine physiologique vers sa forme pathogénique adoptant une structure amyloïde riche en feuillets β , capable de s'agréger ; 2. La transmission de l'information pathogénique à la forme physiologique de la cellule hôte infectée par un phénomène de transconformation (« seeding ») ; 3. La propagation inter-cellulaire, infectant de nouvelles cellules et de nouvelles structures (« spreading »). L'absence de transmission inter-individuelle au sein d'une même espèce ou inter-espèce suggère que l' α -synucléine n'est pas une protéine prion mais une protéine dite « prion-like ». D'après (**Arotçarena & Dehay, Pratique Neurologique FMC, 2018**)

Effets toxiques cellulaires liées à l' α -synucléine

Le rôle toxique de l' α -syn dans les phénomènes neurodégénératifs est aujourd'hui admis, même si les mécanismes précis par lesquels l' α -syn est impliquée ne sont pas totalement compris. Les modèles de synucléinopathies tels que les modèles transgéniques de la MP ou de l'AMS surexprimant l' α -syn sauvage ou mutée ainsi que les modèles d'injection d' α -syn pathogénique (formes synthétiques d' α -syn, homogénats de cerveaux de patients ou fractions purifiés de LB ou GCI) présentent tous une neurodégénérescence dopaminergique plus ou moins élevée (**Bleasel *et al.*, Acta neuropathologica communications, 2016, Recasens *et al.*, Cell and Tissue Research, 2018, Van der Perren *et al.*, Behavioral Neurobiology of Huntington's Disease and Parkinson's Disease, 2015**).

Cependant, l'identification des formes pathogéniques toxiques de l' α -syn est aujourd'hui un axe de recherche important. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant la forme pathogénique

responsable de la toxicité de l' α -syn parmi les différentes espèces produites lors du processus agrégatif de la protéine. Une première hypothèse suggère que les oligomères, intermédiaires dans le processus agrégatif, constituent l'espèce pathogénique de la protéine (**Cremades *et al.*, Cell, 2012, Winner *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011**). En effet, les formes mutées incapables de former des fibres s'avèrent plus toxiques que la forme sauvage (**Ghosh *et al.*, Biochemistry, 2014, Lázaro *et al.*, Acta Neuropathologica Communications, 2016, Lázaro *et al.*, PLOS Genetics, 2014, Ruf *et al.*, ACS Chemical Neuroscience, 2019**). De plus, les formes oligomériques possèdent une capacité plus accrue à se lier aux membranes lipidiques, pouvant engendrer des effets délétères de perméabilisation cellulaire et des organelles (**Fusco *et al.*, Science, 2017**). La deuxième hypothèse concerne les formes les plus matures de l' α -syn telles que les LB et GCI. Les neurones présentant des LB notamment démontrent d'une sensibilité plus élevée à la mort neuronale (**Osterberg *et al.*, Cell reports, 2015, Pieri *et al.*, Scientific Reports, 2016**). Cette hypothèse est aujourd'hui contestée et l'idée que ces inclusions agiraient comme un piège pour les formes oligomériques toxiques, afin de protéger la cellule, émerge (**Dehay *et al.*, The Lancet Neurology, 2015**).

La toxicité de la protéine α -syn au niveau cellulaire est pléiotropique (**Figure 16**). Sa propension à se lier aux lipides membranaires induit des altérations morphologiques et physiologiques dans le contexte pathologique, que ce soit au niveau de la membrane cellulaire ou des organites tels que la mitochondrie ou les lysosomes. Une altération du transport vésiculaire est également observée lorsque l' α -syn adopte un comportement pathologique (**Choi *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013**). Le transport des protéines du compartiment golgien au réticulum endoplasmique est également affecté par l' α -syn toxique, amenant une réponse de stress du réticulum et une dysfonction du système de production et de qualité protéique (**Cooper *et al.*, Science (New York, NY), 2006**). Enfin, les systèmes de dégradation tels que le système ubiquitine/protéasome (**Zondler *et al.*, PloS one, 2017**) et le système autophagique (**Dehay *et al.*, J Neurosci, 2010**) sont altérés par l'action toxique de l' α -syn. Ainsi, la toxicité liée à l' α -syn s'illustre de manière multifactorielle dans différents processus cellulaires amenant à une dérégulation homéostasique cellulaire qui participe au processus de neurodégénérescence. Cependant, les mécanismes d'action précis impliqués dans la toxicité de l' α -syn restent inconnus.

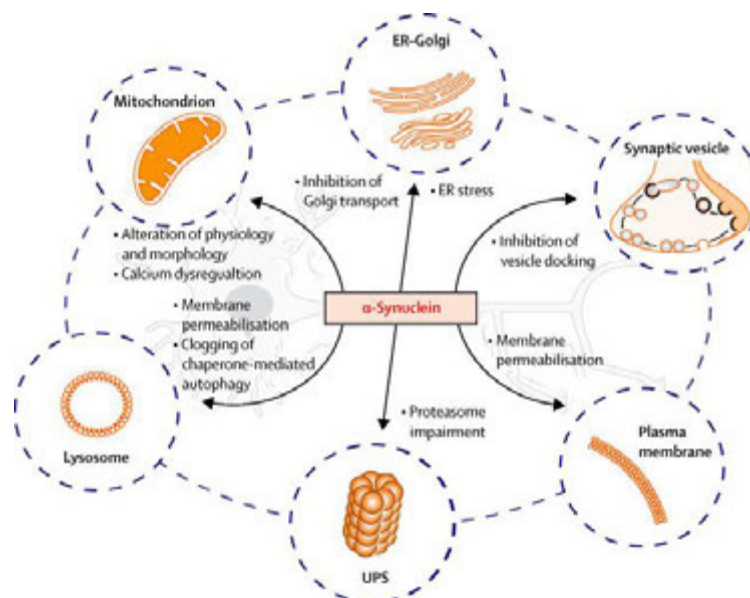


Figure 16 : Schéma explicatif illustrant les effets pléiotropes toxiques cellulaires de l'α-synucléine. L'effet de l'α-synucléine sur les fonctions cellulaires telles que le transport Golgi-réticulum endoplasmique, le trafic vésiculaire synaptique, l'intégrité membranaire, la respiration mitochondriale, le système ubiquitine/protéasome et l'autophagie est ici représenté. D'après (Dehay *et al.*, *The Lancet Neurology*, 2015)

Approches thérapeutiques envisagées pour lutter contre l'α-synucléine pathologique

Différentes stratégies thérapeutiques sont aujourd'hui envisagées afin de contrecarrer les effets toxiques de l'α-syn en plus de lutter contre les mécanismes de neurodégénérescence (Schapira *et al.*, *The Lancet*, 2014). Ces stratégies visent notamment à combattre les propriétés « prion-like » d'agrégation ou de propagation précédemment décrites (Figure 17) (Lashuel *et al.*, *Nature reviews Neuroscience*, 2013).

Afin de réduire la propagation de l'α-syn, des immunothérapies à base d'anticorps qui viennent piéger les formes suggérées toxiques de la protéine, telles que les oligomères, sont proposées.

Afin de réduire directement l'agrégation de l'α-syn, plusieurs stratégies sont proposées :

- ❖ Réduire la synthèse de la protéine par des approches de biologie moléculaire afin de réduire l'accumulation de la protéine et ainsi son agrégation ;
- ❖ Réduire directement le processus agrégatif de la protéine par l'utilisation de molécules anti-agrégantes, ou en induisant des modifications post-traductionnelles connues pour diminuer la capacité agrégative de la protéine ;
- ❖ Augmenter la dégradation de l'α-syn par activation des systèmes de clairance ciblant la protéine, tels que le système ubiquitine/protéasome ou bien la voie autophagique.

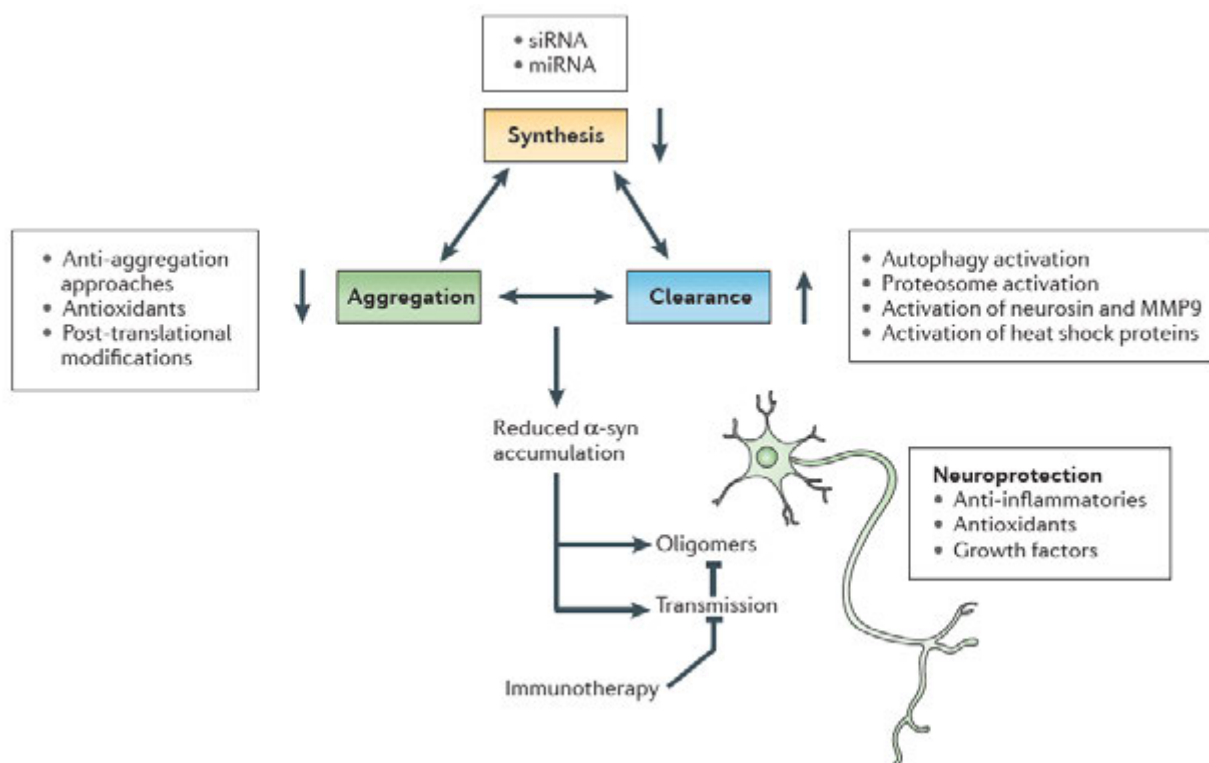


Figure 17 : Stratégies thérapeutiques envisagées ciblant l'agrégation et la propagation de l' α -synucléine. D'après (Lashuel *et al.*, Nature reviews Neuroscience, 2013)

III. L'autophagie : une cible thérapeutique commune potentielle pour toutes les synucléinopathies

Afin de diminuer la quantité d' α -syn présente dans les cellules et donc sa propension à s'agréger, se propager et à induire une toxicité cellulaire, cibler la machinerie cellulaire impliquée dans la dégradation de la protéine est une thérapie pertinente à envisager.

La dégradation de l' α -synucléine

L' α -syn est une protéine qui est dégradée à la fois par le système ubiquitine/protéasome et par l'autophagie.

Le système ubiquitine/protéasome joue un rôle dans la dégradation des protéines à durée de vie courte, endommagées ou mal-repliées (**Figure 18**). Le système se découpe en deux étapes : une ubiquitination suivie d'une protéolyse, impliquant l'action de plusieurs protéases. L'ubiquitine est d'abord activée par une enzyme activatrice dite E1, puis se lie sur une conjugase dite E2 avant d'être transférée via une liaison à un résidu Lysine de la protéine par une transférase dite E3. Cette

cascade enzymatique se produit plusieurs fois pour une même protéine ciblée pour la dégradation afin de former une chaîne d'ubiquitines associée à la protéine. Cette chaîne de poly-ubiquitination agit comme un signal pour une dégradation pour le protéasome et la protéine poly-ubiquitinylée est alors adressée au complexe du protéasome constitué d'unités 20S et 19S, afin d'y être dégradée en peptides. Les peptides sont ensuite libérés dans le cytoplasme et sont transformés en acide aminés par des enzymes cellulaires telles que les aminopeptidases. Par sa richesse en Lysine au niveau du N-terminal, l' α -syn est un substrat du protéasome (**Bennett *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 1999**).

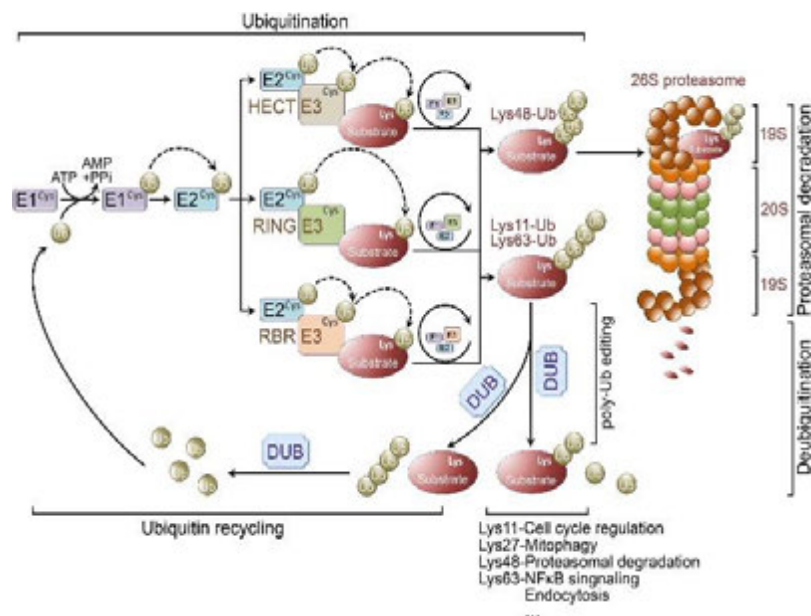


Figure 18 : Le système ubiquitine/protéasome de dégradation protéique. Après la répétition de l'étape d'ubiquitination par les enzymes E1, E2 et E3, la protéine est poly-ubiquitinylée. Elle est alors soit adressée au complexe du protéasome pour y être dégradée en peptides, ou recyclée après une dé-ubiquitination. D'après (**Zheng *et al.*, Frontiers in Aging Neuroscience, 2016**)

En parallèle, la dégradation de l' α -syn est également assurée par l'autophagie, qui est un système complexe permettant la dégradation de protéines à durée de vie longue, mais également des agrégats protéiques et des organelles endommagés ou vieillissants. L'autophagie est divisée en quatre systèmes de dégradation : la macroautophagie non-sélective et sélective, l'autophagie médiée par les protéines chaperons et la microautophagie (**Scrivero *et al.*, The Lancet Neurology, 2018**).

La microautophagie est une voie de dégradation non sélective qui implique l'invagination de tubes autophagiques contenant le matériel directement dans le lumen lysosomal (**Li *et al.*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2012**).

La macroautophagie sélective décrit la dégradation spécifique d'organites défectueux tels que la mitochondrie (mitophagie) ou le peroxisome (pexophagie). Ce mécanisme implique une

reconnaissance et une séquestration spécifique du cargo de matériel par les vésicules appelées autophagosomes, et assurées par des récepteurs et/ou la présence de signal de dégradation tels que l'ubiquitinylation du matériel à dégrader (Zaffagnini & Martens, *Journal of molecular biology*, 2016).

La macroautophagie non-sélective (MA, *macroautophagy*) est une voie de dégradation non spécifique impliquant la formation de vésicules double-membrane formant un cargo séquestrant le matériel à dégrader et appelées autophagosomes qui, dans une deuxième étape, fusionnent avec les lysosomes qui contiennent le matériel enzymatique de dégradation (Figure 19).

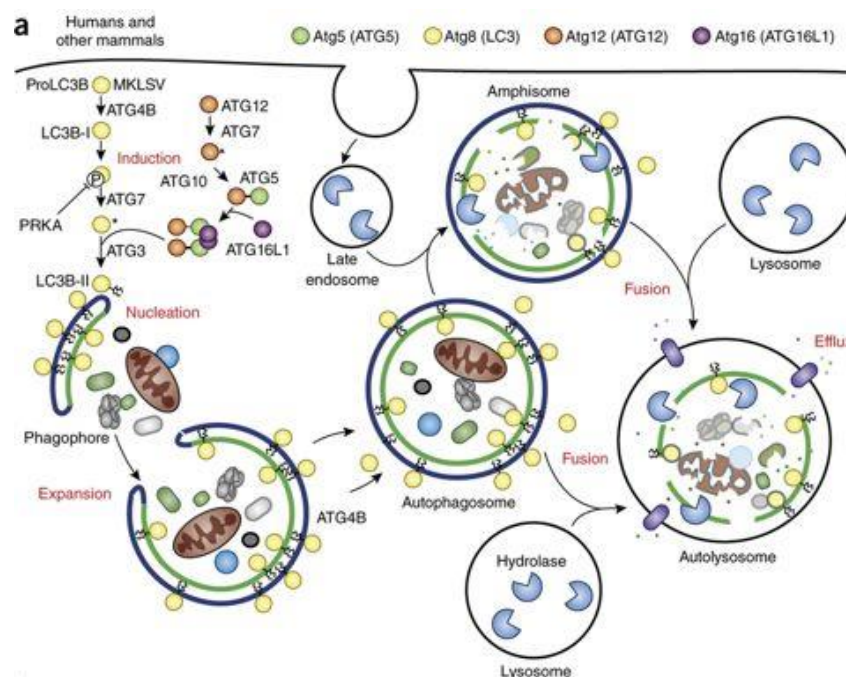


Figure 19 : Processus détaillé de la macroautophagie (MA). Le processus commence par une nucléation du phagophore qui requiert la fonction de la protéine Atg8 (LC3B-I), précédemment conjuguée à une phosphatidylethanolamine (LC3B-II) par différentes protéines Atg (*Autophagy related gene*). Le phagophore subit ensuite une étape d'expansion afin de séquestrer le matériel à dégrader jusqu'à la formation d'une vésicule double-membrane appelée autophagosome. Lors de cette étape de maturation, la protéine LC3B-II est libérée de la membrane externe de l'autophagosome après une dé-conjugaison via la protéine Atg4. L'autophagosome fusionne par la suite soit avec un endosome tardif formant un amphisome, soit directement avec un lysosome qui contient les hydrolases et formant un autolysosome dans lequel le matériel est dégradé. D'après (Klionsky & Schulman, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014)

Contrairement à la MA, l'autophagie médiée par les protéines chaperons (CMA, *Chaperon-Mediated Autophagy*) est une voie de dégradation sélective qui implique la reconnaissance d'un pentapeptide (motif type KFERQ) sur la séquence de la protéine cible par la protéine chaperon cytosolique Hsc70 (cytosolic chaperone heat-shock cognate 70kDa). Une fois la liaison établie

entre la protéine Hsc70 et la protéine cible, le complexe est redirigé vers le récepteur membranaire lysosomal LAMP2a (Lysosomal Associated Membrane Protein 2 – isoform A) qui assure l’internalisation de la protéine dans le lysosome pour sa dégradation. La quantité du récepteur LAMP2a est donc le facteur limitant du processus de la CMA. (**Figure 20**)

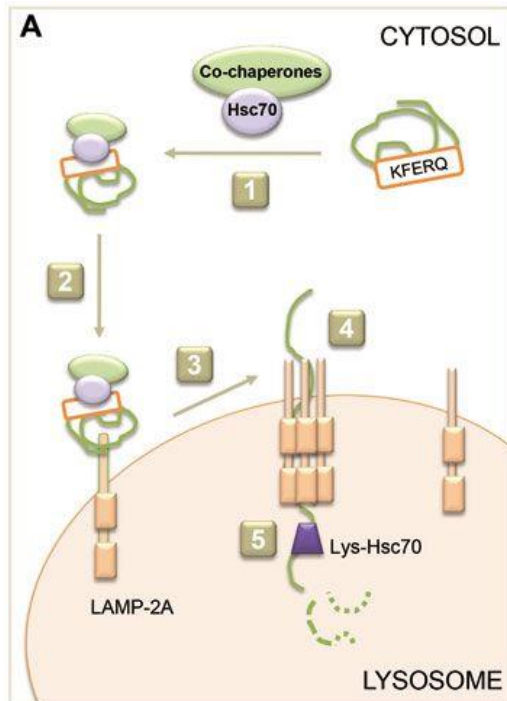


Figure 20 : Etapes de l’autophagie médiée par les protéines chaperons. (1) La protéine Hsc70 et les co-chaperones interagissent avec la protéine cible au niveau du motif de reconnaissance de type KFERQ ; (2) Le complexe nouvellement formé est adressé à la surface lysosomale ; (3) La protéine substrat interagit avec la partie C-terminale cytosolique du récepteur lysosomal LAMP2a ; (4) La protéine substrat est alors internalisée dans le lumen lysosomal ; (5) La protéine est dégradée par les enzymes lysosomales. D’après (**Cuervo & Wong, Cell Research, 2013**)

Lorsque la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin) est activée, elle régule négativement la voie de la macroautophagie. L’inhibition de mTORC1 par la drogue rapamycin entraîne l’activation de la MA et la dégradation des formes sauvages et mutées de l’ α -syn *in vitro* (**Webb et al., Journal of Biological Chemistry, 2003**). Réciproquement, l’utilisation de drogues telles que l’inhibiteur de la kinase PI3K – la 3-méthyladenine (3-MA) - ou l’inhibiteur de la fusion autophagosome-lysosome - la BafilomycineA1 (Baf_{A1}) - entraîne l’inhibition de la MA et l’augmentation des niveaux intracellulaires de l’ α -syn *in vitro* (**Lee et al., The Journal of Neuroscience, 2004, Webb et al., Journal of Biological Chemistry, 2003**) . La voie de la MA semble être impliquée dans la dégradation des formes agrégées de l’ α -syn puisqu’une surexpression du régulateur de la MA Beclin-1 dans des cellules surexprimant l’ α -syn sauvage entraîne une diminution des taux des formes agrégées de la protéine mais aucune atteinte de la quantité de la forme monomérique (**Lee et al., The Journal of Neuroscience, 2004, Spencer et al., J Neurosci, 2009**). Chez des souris transgéniques exprimant l’ α -syn, la protéine α -syn est retrouvée colocalisée avec la protéine lysosomale LAMP2 et le marqueur des autophagosomes LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3), suggérant que l’ α -syn est bien dégradée par les lysosomes (**Klucken et al., Autophagy, 2012**). Ces données suggèrent que l’ α -

syn est la cible d'une dégradation par la voie de la macroautophagie, notamment pour ses formes agrégées (**Figure 21**).

Or, une étude suggère que la quantité d'agrégats d' α -syn humaine formés *in vitro* après une exposition des cellules COS-7 à la roténone, diminue lorsque les cellules sont traitées avec Baf_{A1} mais pas après l'utilisation de l'inhibiteur 3-MA (**Lee et al., The Journal of Neuroscience, 2004**). Ce résultat confirme ainsi le rôle des lysosomes dans la dégradation mais par une voie non-macroautophagique. La même année, l'équipe de Cuervo a montré que la demi-vie de l' α -syn augmente après traitement de culture de neurones dopaminergiques de rat avec du chlorure d'ammonium (inhibiteur lysosomal) mais pas lorsque l'inhibiteur 3-MA est utilisé, confirmant l'hypothèse d'une voie non-macroautophagique dans la dégradation de l' α -syn (**Cuervo et al., Science, 2004**). De manière intéressante, la séquence de la protéine α -syn contient un pentapeptide VKKQ, correspondant au motif de reconnaissance de la voie de la CMA (**Mak et al., J Biol Chem, 2010**). Une mutation au sein de ce motif entraîne une diminution drastique de l'adressage de la protéine au lumen lysosomal (**Cuervo et al., Science, 2004**). De même, diminuer l'expression du facteur limitant de la CMA, le récepteur LAMP2a, dans des neurones corticaux de rat, entraîne une augmentation des formes solubles et insolubles de l' α -syn (**Vogiatzi et al., The Journal of biological chemistry, 2008, Xilouri et al., Autophagy, 2016**). Ces données mettent donc en lumière la voie de l'autophagie médiée par les protéines chaperons comme une voie préférentielle de dégradation autophagique de la protéine α -syn sauvage (**Figure 21**).

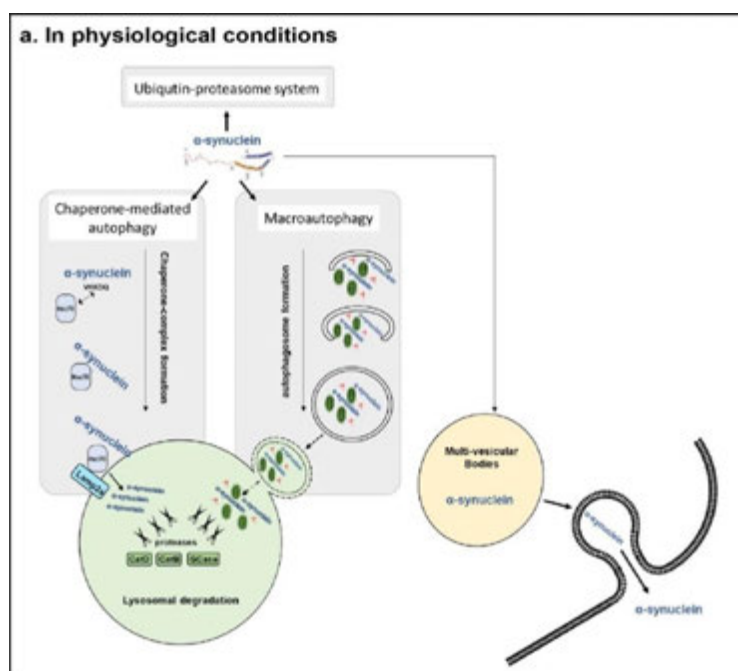


Figure 21 : Voies de dégradation autophagique de l' α -synucléine. La dégradation de l' α -synucléine est assurée par les deux voies autophagiques que constituent la macroautophagie et la voie de l'autophagie médiée par la protéine chaperon. Ces deux voies engendrent la dégradation de la protéine dans le compartiment lysosomal. Lorsqu'elle n'est pas dégradée, la protéine est recrutée dans des corps multi-vésiculaires avant une libération extracellulaire via la voie exosomale. D'après (**Arotcarena et al., Cells, 2019**)

De plus, la protéolyse lysosomale de l' α -syn est assurée par différentes cathepsines à cystéine d'une manière conformationnelle-dépendante. La Cathepsine D semble assurer la dégradation de la protéine liée aux lipides membranaires, tandis que la Cathepsine B semble spécifique de la forme monomérique et la Cathepsine L assure la dégradation des formes monomériques et fibrillaires de la protéine (**McGlinchey & Lee, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015**). De même, la protéolyse lysosomale associée à ces mêmes cathepsines est à l'origine des formes tronquées de la protéine, retrouvées chez les patients parkinsoniens (**McGlinchey et al., Journal of Biological Chemistry, 2019**).

En revanche, les formes mutées A30P ou A53T de l' α -syn semblent être spécifiquement dégradées par la voie macroautophagique car elles ne sont que peu internalisées dans le lumen lysosomal malgré une forte affinité pour le récepteur de la CMA, LAMP2a (**Cuervo et al., Science, 2004**).

La protéine α -syn est donc dégradée par deux voies de l'autophagie qui constituent la macroautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperons. La contribution de chacune des voies avec le système ubiquitine/protéasome dans la dégradation de la protéine reste à ce jour encore grandement débattue. De nombreuses études sont encore nécessaires pour comprendre vers quelles voies vont être adressées les différentes formes de la protéine.

L'autophagie : une machinerie surmenée dans les synucléinopathies

Cependant, de nombreuses preuves suggèrent aujourd'hui qu'une dysfonction autophagique est un fort contributeur de l'accumulation de l' α -syn dans les synucléinopathies.

La fonction autophagique est altérée dans les synucléinopathies

Les premières preuves sont génétiques et démontrent de l'implication de mutations dans différents gènes, codant pour des acteurs autophagiques, dans le développement de la pathologie (**Figure 22**). Les formes familiales de la MP associées à une mutation dans le gène *PARK9* codant pour le transporteur lysosomal ATPase de cations (ATP13A2) induisent une pathologie précoce (**Ramirez et al., Nat Genet, 2006**). La mutation dans le gène *PARK9* entraîne la production d'une forme tronquée de la protéine, qui est anormalement retenue au niveau du réticulum endoplasmique avant une dégradation précoce (**Ramirez et al., Nat Genet, 2006**). Une accumulation de vacuoles autophagiques est observée sur des cultures de fibroblastes dérivées de patients parkinsoniens portant des mutations sur le gène *PARK9*, suggérant un déficit dans le

mécanisme de clairance des autophagosomes par les lysosomes (**Dehay *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2012**). De même, des mutations dans les gènes impliqués dans la CMA tels que le gène *DNAJC6* codant pour la protéine de choc thermique DNAJC6 (*DnaJ heat shock protein family member 6*) (**Edvardson *et al.*, PLoS One, 2012**) ou le gène codant pour la protéine DNAJC13 (**Gustavsson *et al.*, Mov Disord, 2015**) ont également été reportées comme formes familiales.

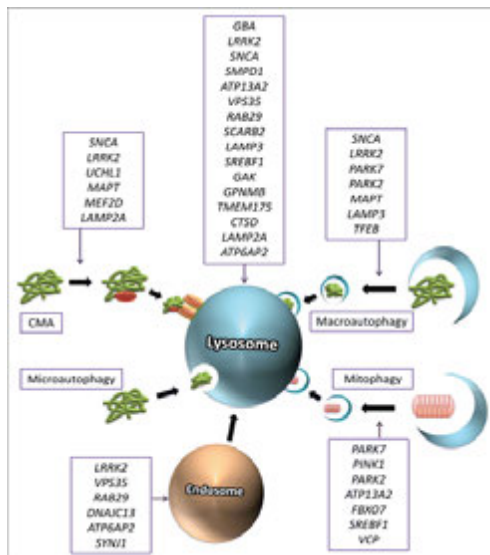


Figure 22 : Gènes associés à la maladie de Parkinson et leur contribution autophagique. D'après (Gan-Or *et al.*, Autophagy, 2015)

En parallèle, des mutations dans les gènes codant pour les protéines impliquées dans la dégradation spécifique des mitochondries (mitophagie) ont également été reportées dans les cas familiaux de la MP. Ainsi, des mutations autosomales récessives dans le gène *PARK2* codant pour la protéine ubiquitine-ligase E3 Parkin, entraînant une perte de fonction de la protéine, ont été les secondes mutations identifiées dans les cas familiaux de la MP (**Hattori *et al.*, Annals of Neurology, 1998, Hattori *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, Kitada *et al.*, Nature, 1998, Leroy *et al.*, Human Genetics, 1998, Lücking *et al.*, The Lancet, 1998, Matsumine *et al.*, American journal of human genetics, 1997**). De même, dans 1 à 9% des cas familiaux, des mutations affectant le gène *PARK6* codant pour le deuxième acteur de la mitophagie que constitue la protéine kinase PINK1 (*phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1*) ont été identifiées (**Valente *et al.*, The American Journal of Human Genetics, 2001, Valente *et al.*, Neurological Sciences, 2002, Valente *et al.*, Annals of Neurology, 2002**).

Enfin, les études d'association pangénomiques ont permis de mettre en avant le gène *GBA1*, codant pour l'enzyme lysosomale β -Glucocerebrosidase (GCCase) impliquée dans le métabolisme glycolipidique, comme un facteur de risque de développer la MP (**Hruska *et al.*, Hum Mutat, 2008**). Une diminution de l'activité de la GCCase est ainsi observée dans le cervelet, l'amygdale, le putamen et la SN des patients portant ces mutations. Des mutations autosomales récessives héréditaires dans le même gène *GBA1* sont à l'origine d'une maladie lysosomale appelée la

maladie de Gaucher. Dans cette maladie, une perte de fonction de la protéine est observée et amène à une accumulation de glucocerebrosides affectant le foie, le sang, la rate, les poumons et le système nerveux. Or, 8 à 14% des patients parkinsoniens sporadiques présentent dans leur génome une mutation dans le gène *GBA1*, suggérant un plus haut risque de développer la maladie, associé à des mutations dans ce gène (Neumann *et al.*, **Brain**, 2009). De même, les patients atteints de la maladie de Gaucher présentent un risque plus élevé de développer la MP (Sidransky *et al.*, **New England Journal of Medicine**, 2009). Une réduction de l'activité de la protéine GCase est observée notamment dans la substance noire des patients sporadiques atteints de DLB et de la MP, porteurs ou non-porteurs de mutations au niveau du gène *GBA1* (Gündner *et al.*, **Neurobiology of Disease**, 2019). Récemment, une nouvelle étude a mis en évidence de multiples *loci* impliqués dans des maladies lysosomales comme facteurs de risque de la MP, renforçant l'idée d'un déficit autophagique dans le développement de la MP (Robak *et al.*, **Brain**, 2017).

Au niveau post-mortem, dès 1997, Anglade et ses collaborateurs découvrent une déficience autophagique par l'observation d'une diminution drastique du nombre de vacuoles autophagiques dans les neurones dopaminergiques nigraux de patients parkinsoniens sporadiques, comparé à des contrôles sains (Anglade *et al.*, 1997). L'analyse des cerveaux post-mortem de patients atteints de synucléinopathies soulignent la présence de la protéine autophagosomale LC3 dans les LB de la SNpc de patients parkinsoniens (~80%) (Alvarez-Erviti *et al.*, **Arch Neurol**, 2010, Dehay *et al.*, **J Neurosci**, 2010), de l'hippocampe et du cortex temporal de patients atteints de DLB (Crews *et al.*, **PLoS One**, 2010a, Higashi *et al.*, **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, 2011), ainsi que dans les GCI notamment dans la région du pont (~84%) des patients atteints d'AMS (Schwarz *et al.*, **J Mol Neurosci**, 2012, Tanji *et al.*, **Neurobiol Dis**, 2013) (Figure 23). Cette observation suggère une association entre un déficit autophagique, notamment une accumulation et une baisse de la clairance des autophagosomes, et l'accumulation de l' α -syn dans les synucléinopathies. De même, la protéine ATP13A2 semble être un composant des LB, puisque la protéine a été localisée au sein des LB dans 90% des neurones dopaminergiques de la SN de patients parkinsoniens (Dehay *et al.*, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2012, Murphy *et al.*, **Acta neuropathologica communications**, 2013). Ce déficit autophagique semble être un évènement systémique puisque l'activité de la MA et de la CMA est également réduite au sein des cellules mononucléées sanguines périphériques provenant de patients atteints de la MP (Papagiannakis *et al.*, **Neurosci Lett**, 2019).

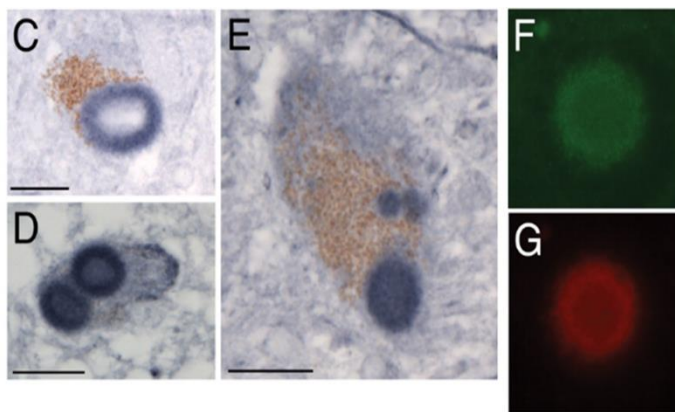


Figure 23 : La protéine LC3 est présente au sein des corps de Lewy dans la SN de patients parkinsoniens. (C-E) Immunomarquage de la protéine LC3 (bleu) au sein des corps de Lewy. Marron : neuromélanine. (F-G) Les corps de Lewy sont co-immuno-marqués par l' α -synucleine (vert, F) et la protéine LC3 (rouge, G). D'après (Dehay *et al.*, *J Neurosci*, 2010).

Au niveau cellulaire, le niveau protéique des composants lysosomaux tels que la protéine LAMP1 et la protéine ATP13A2 est réduit dans les neurones des patients parkinsoniens, comparé aux contrôles sains, suggérant une baisse de l'activité lysosomale macroautophagique (Chu *et al.*, *Neurobiol Dis*, 2009, Dehay *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, Murphy *et al.*, *Acta neuropathologica communications*, 2013). Ces données peuvent s'expliquer par la diminution de l'expression d'un des facteurs de transcription impliqué dans la régulation de la macroautophagie appelé LMX1B (LIM homeobox transcription factor 1 beta) dans les neurones dopaminergiques des patients parkinsoniens (Laguna *et al.*, *Nat Neurosci*, 2015). Chez les patients atteints d'AMS, une dérégulation de la macroautophagie a été également suggérée par l'observation d'une distribution aléatoire des protéines LAMP1 et LAMP2 au sein des cellules constituant les fibres olivo-ponto-cerebelleuses (Makioka *et al.*, *Neuroreport*, 2012) ainsi qu'une accumulation de la protéine LC3-II (Monzio Compagnoni *et al.*, *Stem Cell Reports*, 2018). De même, les niveaux d'expression des gènes codant pour la protéine GABARAP (Gamma-aminotuberic acid receptor-associated protein) et pour la protéine GATE-16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa), impliquées dans la formation des autophagosomes, sont aussi diminués dans le cervelet des patients atteints d'AMS (Tanji *et al.*, *Neurobiol Dis*, 2013), confirmant un déficit macroautophagique dans les synucléinopathies.

Un déficit dans le mécanisme d'autophagie médiée par les protéines chaperons est également observée en post-mortem chez les patients atteints de synucléinopathies. Les niveaux protéiques du facteur limitant LAMP2a et de la protéine Hsc70 sont réduits dans la SN et l'amygdale des patients parkinsoniens (Alvarez-Erviti *et al.*, *Arch Neurol*, 2010). La baisse de leurs niveaux protéiques corrèle positivement avec l'accumulation de la protéine α -syn aux stades précoces de la pathologie (Murphy *et al.*, *Mov Disord*, 2015). De même, la protéine α -syn co-localise avec la protéine Hsc70 dans les oligodendrocytes de patients atteints d'AMS (Chiba *et al.*, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2012), corroborant l'idée d'un déficit de la CMA dans les synucléinopathies.

La fonction lysosomale est également affectée dans les synucléinopathies avec une activité réduite de la protéine GCase dans le cervelet (24%) et la SN (33%) des patients parkinsoniens (**Chiasserini et al., Mol Neurodegener, 2015, Gegg et al., Ann Neurol, 2012, Moors et al., Molecular neurobiology, 2019**) qui corrèle positivement avec une augmentation des taux d' α -syn aux stades précoces de la pathologie (**Gündner et al., Neurobiology of Disease, 2019, Murphy et al., Brain, 2014**). L'activité de la GCase est également diminuée dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients parkinsoniens, comparé aux individus sains (**Balducci et al., Movement Disorders, 2007, Parnetti et al., Mov Disord, 2014**) ainsi que dans les monocytes (**Atashrazm et al., Scientific reports, 2018**). Une diminution de l'activité des enzymes lysosomales α -aminosidase (**Balducci et al., Movement Disorders, 2007**) et α -fructosidase (**van Dijk et al., Mov Disord, 2013**) ainsi qu'une augmentation de l'activité des enzymes β -hexosaminidases (**Parnetti et al., Mov Disord, 2014**) et β -galactosidase (**van Dijk et al., Mov Disord, 2013**) sont également observées dans le LCR des patients parkinsoniens, preuve d'une altération généralisée de l'activité lysosomale. Une altération de l'activité enzymatique de l'hydrolase lysosomale Cathepsin D (CathD) est également observée chez les patients atteints de synucléinopathies avec une diminution d'activité dans la SN des patients parkinsoniens (**Chu et al., Neurobiol Dis, 2009, Moors et al., Molecular neurobiology, 2019**) et une augmentation d'activité dans les fibres ponto-cérébelleuses de patients atteints d'AMS (**Makioka et al., Neuroreport, 2012, Tanji et al., Neurobiol Dis, 2013**). La mesure des taux protéiques des enzymes lysosomales dans le LCR des patients permettrait de les différencier de sujets sains en combinaison avec d'autres biomarqueurs potentiels supplémentaires (**Moors et al., Movement Disorders, 2016**).

Ainsi, les patients atteints de synucléinopathies démontrent d'un déficit autophagique généralisé avec une altération de la voie macroautophagique et de la voie de l'autophagie médiée par les protéines chaperons, associée à un déficit lysosomal.

L'altération de la fonction autophagique : acteur majeur de l'accumulation de l' α -synucléine

Etant donné que l' α -syn est dégradée via ces deux voies, le déficit de la machinerie de dégradation cellulaire observé est associé à une accumulation de la protéine (**Figure 24**). Bien que tous les modèles de synucléinopathies présentent à la fois une accumulation d' α -syn et une altération autophagique, seules les preuves d'un lien direct entre une altération des acteurs autophagiques et de l'accumulation de l' α -syn seront développées dans cette partie. Une inhibition du système autophagique par un knock-out conditionnel dans les neurones dopaminergiques du gène *Atg7*

(Autophagy-related protein 7) entraîne une accumulation d' α -syn (**Sato *et al.*, Sci Rep, 2018**). Dans des cultures de fibroblastes provenant de patients porteurs de mutations dans le gène *PARK9* (ATP13A2), une accumulation d' α -syn est observée, associée à la diminution de l'activité protéolytique (**Dehay *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, Usenovic *et al.*, J Neurosci, 2012**). De même, diminuer l'expression d'ATP13A2 dans des cultures de neurones primaires murins entraîne l'accumulation de la protéine α -syn (**Usenovic *et al.*, J Neurosci, 2012**) démontrant le lien direct entre la déficience autophagique induite par la perte de fonction d'ATP13A2 et l'apparition de la synucléinopathie. Une déficience en ATP13A2 mène également à une diminution de l'exocytose lysosomale de la protéine α -syn, due à une altération des niveaux calciques lysosomaux, amenant à une accumulation intracellulaire de la protéine (**Tsunemi *et al.*, J Neurosci, 2019**).

Dans la même ligne de démonstration du rôle du déficit autophagique dans l'accumulation de l' α -syn, inhiber l'expression de la protéine LAMP2a ou Hsc70 *in vitro* ou dans les cellules dopaminergiques dans un modèle rat de la MP entraîne l'accumulation de vacuoles autophagiques entourées de corps d'inclusions d' α -syn, également positifs pour la protéine ubiquitine (**Alvarez-Erviti *et al.*, Cell Death Dis, 2013, Li *et al.*, Int J Mol Sci, 2014, Vogiatzi *et al.*, The Journal of biological chemistry, 2008, Xilouri *et al.*, Autophagy, 2016**). Ceci suggère qu'une détérioration de la voie de la CMA entraîne l'accumulation et l'agrégation de l' α -syn.

Enfin, une corrélation significative entre la diminution de l'activité de la GCCase et l'augmentation des niveaux d' α -syn phosphorylée a été retrouvée dans la SN des patients parkinsoniens, associée à une augmentation des taux de glucosylsphingosines (**Gündner *et al.*, Neurobiology of Disease, 2019**). Une diminution de l'activité de la GCCase via un traitement avec du β -epoxide *in vitro* ou par l'utilisation de modèle de la maladie de Gaucher *in vivo* engendre également l'accumulation et l'agrégation de l' α -syn (**Cleeter *et al.*, Neurochem Int, 2013, Cullen *et al.*, Ann Neurol, 2011, Mazzulli *et al.*, Cell, 2011, Xu *et al.*, Mol Genet Metab, 2011**).

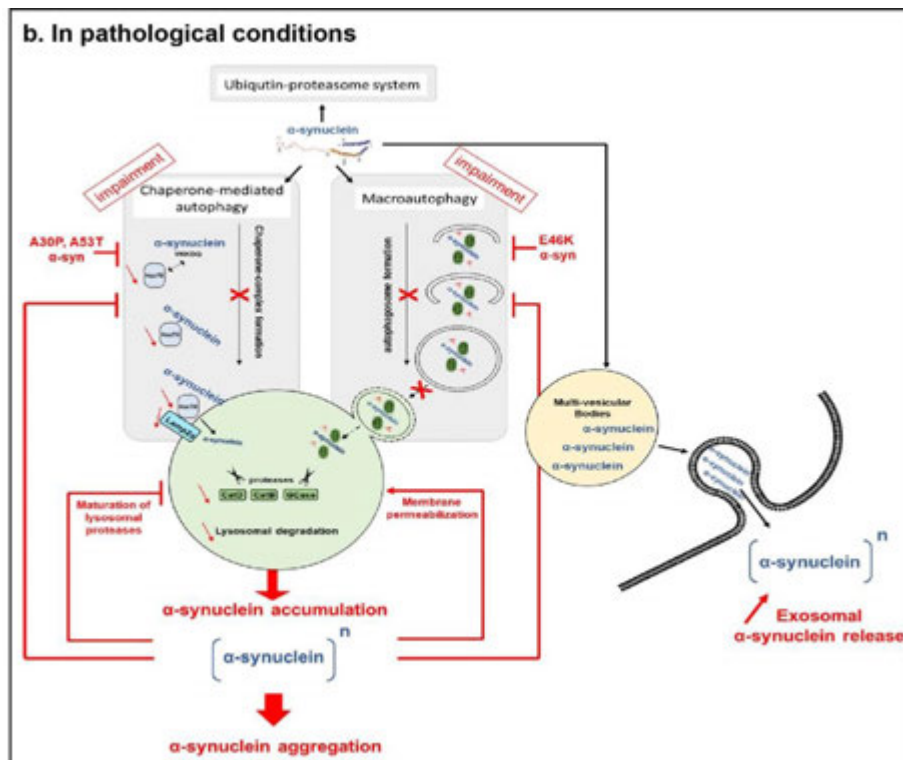


Figure 24 : L'altération autophagique induit l'accumulation et la propagation de la protéine α -synucléine au sein des synucléinopathies. Dans les synucléinopathies, la dysfonction autophagique généralisée induit l'accumulation de l' α -synucléine contribuant à son agrégation. L' α -synucléine est alors recrutée dans les corps multi-vésiculaires et une grande quantité de protéine est alors libérée au niveau extracellulaire, contribuant à la propagation de la synucléinopathie. Enfin, l' α -synucléine sauvage accumulée ou mutée altère également la fonction autophagique, inscrivant le processus dans une boucle sans fin de dyshoméostasie cellulaire. D'après (Arotcarena *et al.*, *Cells*, 2019)

L'altération de la fonction autophagique : acteur majeur de la propagation de l' α -synucléine

La propagation dite « prion-like » de la protéine α -syn est également accrue par ce déficit autophagique. Comme énoncée précédemment, la propagation cellule à cellule de la protéine s'effectuerait notamment par le biais de vésicules d'origine endocytotique formées à partir de corps multi-vésiculaires, appelés exosomes (Soria *et al.*, *Front Neurosci*, 2017). L'inhibition de l'autophagie par l'utilisation de composés chimiques induit une augmentation de la libération de l' α -syn via les exosomes et une hausse de la quantité de protéines présentes dans les cellules receveuses *in vitro* (Alvarez-Erviti *et al.*, *Neurobiol Dis*, 2011, Danzer *et al.*, *Molecular Neurodegeneration*, 2012, Lee *et al.*, *Exp Mol Med*, 2013). Inversement, une activation autophagique diminue considérablement les niveaux d' α -syn libérée dans le milieu de culture cellulaire et le transfert de cellule à cellule de la protéine (Alvarez-Erviti *et al.*, *Neurobiol Dis*, 2011, Danzer *et al.*, *Molecular Neurodegeneration*, 2012, Lee *et al.*, *Exp Mol Med*, 2013,

Poehler et al., Autophagy, 2014). Une injection d'exosomes provenant de LCR dérivé de patients atteints de DLB dans le cerveau de souris sauvages augmente l'occurrence de corps d'inclusions positifs pour l' α -syn au sein des neurones, suggérant qu'une libération exosomale d' α -syn contribue à l'expansion de la synucléinopathie (**Minakaki et al., Autophagy, 2018**). La protéine ATP13A2 semble jouer un rôle déterminant dans la transmission exosomale de l' α -syn puisqu'une diminution de son activité associée aux formes mutées du gène *PARK9* entraîne une production plus importante d'exosomes (**Tsunemi et al., J Neurosci, 2014**). La protéine ATP13A2 semble réguler l'homéostasie du zinc dans ces vésicules, contrôlant ainsi leur libération (**Kong et al., Hum Mol Genet, 2014**). Enfin, une réduction d'expression de l'hydrolase GCase induit une production augmentée d'exosomes et un transfert accru de cellule à cellule de la protéine α -syn (**Bae et al., Nat Commun, 2014**). Ainsi, la déficience autophagique présente dans les synucléinopathies est associée à un plus grand adressage de l' α -syn vers les corps multi-vésiculaires, augmentant sa libération via la voie exosomale et donc sa propagation inter-cellulaire (**Figure 24**).

Altérations de l'autophagie induite par l' α -synucléine

De multiples études ont également reporté le rôle toxique de la protéine α -syn sur le processus autophagique lui-même, contribuant encore à la pathologie par une boucle délétère d'altérations cellulaires induites. Une surexpression d' α -syn sauvage sur des cultures de cellules *in vitro* entraîne l'apparition de structures vésiculaires de morphologie anormale, associée à une réduction de l'activité lysosomale (**Stefanis et al., The Journal of Neuroscience, 2001**). Ce résultat suggère que l' α -syn sauvage inhibe la fonction autophagique, notamment par une altération de la formation des autophagosomes (**Song et al., Autophagy, 2014, Winslow et al., J Cell Biol, 2010, Xilouri et al., PLoS One, 2009**). Un mécanisme possible expliquant cette altération repose sur l'effet de l' α -syn sur la protéine Rab1 (régulateur clef du trafic vésiculaire) qui, en inhibant son activité, perturbe la localisation de la protéine Atg9 essentielle à la biogénèse autophagosomale (**Winslow et al., J Cell Biol, 2010**). Un deuxième mécanisme d'action implique le déclencheur autophagique HMGB1 qui, dans des conditions physiologiques, interagit avec la protéine Beclin-1 afin d'activer le processus autophagique. Il a été montré que l' α -syn interagit avec la protéine HMGB1, inhibant la formation du complexe avec Beclin-1 et par conséquent, l'activation autophagique (**Song et al., Autophagy, 2014**).

L'état conformationnel de la protéine influence également la toxicité de l' α -syn sur la machinerie autophagique. Ainsi, lors de son processus d'auto-oxydation, la dopamine interagit avec la protéine α -syn engendrant un changement conformationnel de la protéine vers des formes

oligomériques sphériques et inhibant ainsi sa fibrillation (Norris *et al.*, **Journal of Biological Chemistry**, 2005). Cette conformation spécifique de la protéine α -syn modifiée inhibe alors la voie de la CMA en interagissant avec la protéine LAMP2a sans être internalisée dans le lumen lysosomal, bloquant ainsi la dégradation des autres substrats de cette même voie de dégradation (Martinez-Vicente *et al.*, **J Clin Invest**, 2008). Les agrégats d' α -syn matures altèrent également l'activité de la machinerie cellulaire (Tanik *et al.*, **J Biol Chem**, 2013), notamment par leur propension à se lier aux lipides membranaires, pouvant conduire à une perméabilisation membranaire, par exemple lysosomale (Freeman *et al.*, **PloS one**, 2013, Stefanovic *et al.*, **FEBS J**, 2014). Lors de sa propagation à une nouvelle cellule, l' α -syn agrégée et pathologique induit une altération de l'activité lysosomale, décrite par l'accumulation de lysosomes de morphologie anormalement dilatée, suggérant l'expansion des déficits autophagiques liés à l' α -syn de par sa transmission intercellulaire (Hoffmann *et al.*, **Sci Rep**, 2019).

En addition des effets de l' α -syn sauvage, les formes pathologiques mutantes exercent également des effets délétères sur la voie autophagique. Les formes mutées A53T et A30P de l' α -syn inhibent la CMA par une interaction forte avec le récepteur LAMP2a sans être internalisées pour une dégradation dans le lysosome, inhibant la voie autophagique médiée par les protéines chaperons (Lei *et al.*, **Cell Death & Disease**, 2019, Xilouri *et al.*, **PLoS One**, 2009, Yang *et al.*, **Science**, 2009). Pour compenser, la voie macroautophagique est alors activée mais ne suffit pas à rétablir les niveaux physiologiques d' α -syn et entraîne même des effets délétères cellulaires. La forme mutée pathologique E46K de l' α -syn induit une inhibition de la formation des autophagosomes via la voie de la protéine JNK1 (Yan *et al.*, **Molecular Neurobiology**, 2014). En conditions physiologiques, la protéine JNK1 phosphoryle la protéine Bcl2, induisant ainsi la libération de la protéine Beclin-1 contenue dans le complexe Bcl2/Beclin-1 qui peut alors exercer son rôle activateur de la macroautophagie. L' α -syn mutée en E46K inactive la protéine JNK1, entraînant ainsi la séquestration de la protéine Beclin-1 dans son complexe avec la protéine Bcl2, inhibant ainsi la macroautophagie.

L' α -syn altère également la fonction lysosomale par son rôle toxique démontré dans la maturation et l'adressage des hydrolases lysosomales (Mazzulli *et al.*, **Cell**, 2011, Mazzulli *et al.*, **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2016). L' α -syn, par son interaction avec le régulateur du trafic vésiculaire Rab1, perturbe l'adressage des hydrolases du compartiment golgien vers le réticulum endoplasmique. De plus, la liaison entre l' α -syn et la protéine GCCase au niveau de son site d'action contribue également à une dysfonction lysosomale (Yap *et al.*, **J Biol Chem**, 2011).

Enfin, l' α -syn altère également les voies spécifiques de dégradation telle que la mitophagie. Il semblerait notamment que la forme A53T de la protéine corrompt le rôle de la protéine Parkin

dans l'adressage des mitochondries défectueuses à la voie de dégradation (**Choubey *et al.*, J Biol Chem, 2011**). Cela induirait un marquage anormal des mitochondries fonctionnelles par Parkin qui s'accumulent alors au niveau des autophagosomes, entraînant un déficit énergétique cellulaire. Ainsi, l'accumulation de l' α -syn au niveau intracellulaire dans les synucléinopathies entraîne une dérégulation autophagique accrue, qui s'inscrit dans un schéma de cercle vicieux de dyshoméostasie cellulaire (**Figure 24**).

Dyshoméostasie autophagique et neurodégénérescence

Outre le rôle de l'altération de l'autophagie dans les propriétés « prion-like » d'agrégation et de propagation de la protéine α -syn, une altération de l'autophagie contribue directement au phénomène de neurodégénérescence, première caractéristique des synucléinopathies.

Inhiber l'expression des gènes liés à l'autophagie tels que Atg5 et Atg7 dans les neurones de souris induit la mort cellulaire neuronale, associée à la présence d'inclusions positives pour l'ubiquitine (de type LB) et entraînant des déficits moteurs (**Hara *et al.*, Nature, 2006, Komatsu *et al.*, Nature, 2006, Komatsu *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007**). Ce résultat met en exergue le rôle d'une altération autophagique dans le processus de neurodégénérescence au sein des synucléinopathies. Les mécanismes décrits jusque-là mettent en jeu une altération lysosomale, de la mitophagie ou du trafic vésiculaire comme acteurs dans le processus de mort cellulaire.

Le processus autophagique requiert la formation maturée du compartiment lysosomal. Ce processus implique le recrutement des protéines LAMP à la membrane lysosomale. Un double knock-out des gènes LAMP1 et LAMP2 chez les souris est léthal avec une mort embryonnaire à des stades de E14.5 à E16.5 et la présence de vacuoles autophagiques contenant du matériel non dégradé (**Jäger *et al.*, Journal of Cell Science, 2004**). L'intégrité du compartiment lysosomal est donc primordiale pour la survie cellulaire et une altération du processus autophagique induit une mort cellulaire. Dans des cultures de cellules souches pluripotentes induites provenant de patients atteints d'AMS et différenciées en neurones, une accumulation de matériel non dégradé est également observée, suggérant un déficit lysosomal (**Monzio Compagnoni *et al.*, Stem Cell Reports, 2018**). Le rôle de dégradation lysosomale repose sur l'activité d'enzymes, qui demeure optimale dans un environnement acide. Ainsi, le maintien du pH du lumen lysosomal à des valeurs de 4,5 et 5 est essentiel à la fonction lysosomale. Une alcalinisation du lumen lysosomal est observée dans les modèles animaux parkinsoniens, amenant à une dysfonction des hydrolases lysosomales (**Bourdenx *et al.*, Autophagy, 2016, Dehay *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2012**).

Le matériel non dégradé s'accumule alors au niveau intracellulaire, entraînant l'accumulation d'organelles défectueuses et la production d'espèces réactives de l'oxygène induisant le processus de mort cellulaire (Dehay *et al.*, J Neurosci, 2010) (Figure 25a).

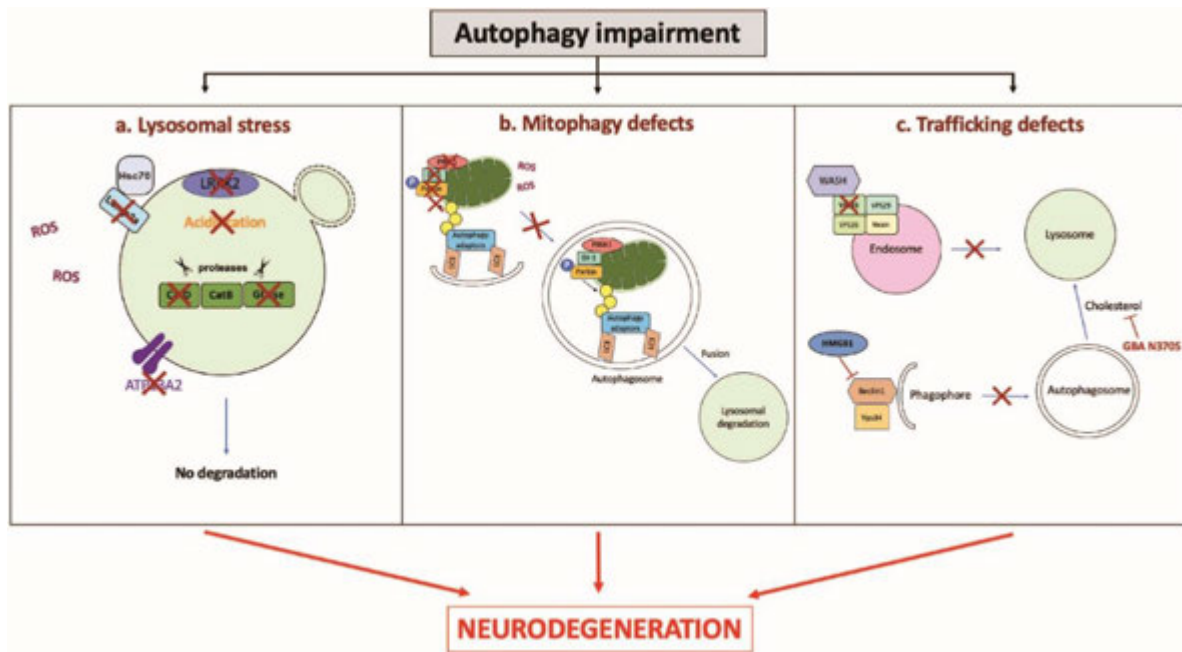


Figure 25 : La dysfonction lysosomale induit une neurodégénérescence dans les synucléinopathies. Les processus par lesquels la neurodégénérescence est induite sont : (a) la présence d'un stress lysosomal caractérisé par des modifications structurales ou une alcalinisation lysosomale associées à une altération fonctionnelle des hydrolases ; (b) un déficit de la mitophagie dépendante de la voie Parkin/PINK1 et DJ-1 ; (c) des altérations du trafic vésiculaire notamment par une dysfonction du complexe WASH et de la protéine VPS35. D'après (Arotcarena *et al.*, Cells, 2019).

Une altération au niveau de la mitophagie, processus spécifique de dégradation des mitochondries défectueuses, joue également un rôle important dans le processus de mort cellulaire. En effet, une régulation stricte du processus de mitophagie permet le contrôle qualité des mitochondries et donc le maintien de la production énergétique cellulaire indispensable à sa survie. Lorsqu'une mitochondrie est défectueuse, la protéine PINK1 est recrutée sur la membrane externe mitochondriale et phosphoryle la protéine Parkin qui, à son tour, va être recrutée au niveau mitochondrial. L'activation de Parkin engendre le recrutement d'une chaîne de poly-ubiquitine, qui est ensuite phosphorylée par PINK1, signal de recrutement par les récepteurs des autophagosomes et l'adressage ultérieur au compartiment lysosomal pour sa dégradation (Youle & Narendra, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010). Or, une altération de ce processus, comme observée dans les synucléinopathies, induit une neurodégénérescence, comme suggéré dans des modèles de *Drosophila melanogaster* (Greene *et al.*, Proceedings of the National

Academy of Sciences, 2003, Park *et al.*, Nature, 2006, Poole *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008) et de souris (Stevens *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015). Le mécanisme amenant à la neurodégénérescence reste à ce jour peu connu bien que de récentes études suggèrent qu'une dérégulation des protéines Parkin et PINK1 induit une réponse inflammatoire contribuant à la mort cellulaire (Sliter *et al.*, Nature, 2018). La présence de mutations dans le gène *PARK8* codant pour la protéine LRRK2 (Leucine Rich Repeat Kinase 2) telle que la substitution G2019S, qui représente 5% des cas familiaux de la MP, régule également la mitophagie dépendante de Parkin/PINK1 (Lesage *et al.*, New England Journal of Medicine, 2006, Martin *et al.*, Journal of neurochemistry, 2014, Zimprich *et al.*, Neuron, 2004). Cette mutation se situe au niveau du domaine kinase, augmentant l'activité enzymatique de la protéine et exacerbant l'inhibition de la mitophagie induite par la protéine LRRK2 (Bonello *et al.*, Human Molecular Genetics, 2019). Une diminution de la mitophagie entraîne une accumulation de mitochondries défectueuses entraînant ainsi un déficit énergétique qui peut être un contributeur à la mort cellulaire (Figure 25b).

Le processus autophagique repose enfin sur l'intégrité du trafic vésiculaire nécessaire dans le transport des endosomes et des autophagosomes et le transfert du cargo aux lysosomes pour y être dégradé. Le rôle de la protéine VPS35 (vacuolar protein sorting-associated protein 35) est indispensable au trafic vésiculaire endosomal. Cette protéine régule la localisation endosomale du complexe WASH, qui interagit alors avec les rétromères et entraîne la formation de filaments d'actine permettant de guider le cargo et d'initier la formation des autophagosomes. Des mutations dans le gène VPS35 sont impliquées dans le développement de la MP et réduisent la localisation du complexe WASH au niveau endosomal, entraînant des déficits du transport vésiculaire (Zavodszky *et al.*, Nature Communications, 2014, Zimprich *et al.*, The American Journal of Human Genetics, 2011). De plus, Parkin est impliquée dans l'ubiquitination de la protéine VPS35, interagissant ainsi avec le processus de trafic vésiculaire (Williams *et al.*, Human Molecular Genetics, 2018). Lorsque la protéine VPS35 est ubiquitinylée par Parkin, la protéine est recyclée, altérant ainsi le trafic endosomal et donc la fonction lysosomale. En tant que composant membranaire, les lipides jouent également un rôle prépondérant dans le maintien de l'intégrité et de la biogénèse du trafic vésiculaire. Le cholestérol est particulièrement impliqué dans le trafic des autophagosomes. L'altération de l'activité de l'enzyme GCase présente dans les synucléinopathies entraîne l'accumulation du cholestérol et de vésicules multi-lamellaires induisant une altération du processus autophagique (García-Sanz *et al.*, Autophagy, 2018). De plus, l'enzyme GCase est également impliquée dans la production des céramides, constituant

majeur des lipides membranaires et donc nécessaire à l'intégrité du transport et de la biogénèse vésiculaire (**Kim *et al.*, Human Molecular Genetics, 2018**). Une altération fonctionnelle de ces acteurs majeurs du trafic vésiculaire est observée dans les synucléinopathies et entraîne un déficit du transport des vésicules indispensable à l'intégrité de la fonction autophagique, induisant ainsi la mort cellulaire (**Figure 25.c**).

Une régulation fine des processus impliqués dans l'intégrité de la fonction autophagique demeure essentielle au contrôle qualité des protéines et des organelles donc à l'homéostasie cellulaire. Une altération affectant ces processus induit une dysfonction autophagique et contribue au mécanisme de neurodégénérescence caractéristique des synucléinopathies.

Stratégies thérapeutiques pour rétablir la machinerie cellulaire de dégradation

Pour contrecarrer les effets délétères d'une dysfonction autophagique sur l'expansion de la synucléinopathie et le phénomène de neurodégénérescence, une restauration de la fonction autophagique demeure une piste thérapeutique privilégiée. Activer ou restaurer la fonction de la machinerie de dégradation est envisagé afin d'augmenter la clairance des agrégats protéiques, diminuer la propagation de la synucléinopathie et obtenir des effets neuroprotecteurs cellulaires. Différentes pistes ont été proposées afin d'atteindre la clairance des agrégats et un effet neuroprotecteur avec des approches utilisant des composés chimiques ou naturels (**Figure 26**).

La première stratégie vise la voie de la protéine mTOR dans le but d'activer l'autophagie avec :

- ❖ des inhibiteurs directs de la protéine mTOR (Rapamycine) (**Bai *et al.*, Pathobiology of Aging & Age-related Diseases, 2015, Crews *et al.*, PLOS ONE, 2010b, Malagelada *et al.*, The Journal of Neuroscience, 2010, Pan *et al.*, Neuroscience, 2009**)
- ❖ des activateurs de l'AMPK (Resveratrol, Metformine) qui inhibent indirectement mTOR (**Ferretta *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2014, Pérez-Revuelta *et al.*, Cell death & disease, 2014, Wu *et al.*, Neuro-Signals, 2011**)
- ❖ des activateurs des protéines cibles de mTOR telles que le facteur de transcription EB TFEB (2-hydropropyl- β -cyclodextrine, extrait naturel de grenade) (**Decressac *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, Kilpatrick *et al.*, PLoS One, 2015, Song *et al.*, J Biol Chem, 2014, Tan *et al.*, Sci Rep, 2019**)

La seconde stratégie vise à activer la machinerie autophagique de manière indépendante de la voie mTOR avec :

- ❖ le lithium : inhibe l'inositol monophosphatase (IMPase) (Hou *et al.*, BMC neuroscience, 2015, Sarkar *et al.*, The Journal of cell biology, 2005, Xiong *et al.*, Neuroscience, 2011)
- ❖ le sodium valproate : inhibe l'inositol (Ins) (Hou *et al.*, BMC neuroscience, 2015, Li *et al.*, International Journal of Neuroscience, 2012)
- ❖ le tréhalose : active le transporteur membranaire du glucose SLC2A, activant la voie de l'AMPK et donc l'autophagie (He *et al.*, Molecular Neurobiology, 2016, Sarkar *et al.*, NeuroToxicology, 2014, Sarkar *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2007, Tanji *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015)
- ❖ Nilotinib : inhibe la protéine c-Abl (autre inhibiteur de l'autophagie) (Pagan *et al.*, Journal of Parkinson's disease, 2016, Pagan *et al.*, Pharmacology Research & Perspectives, 2019)
- ❖ Ambroxol ou Isofagomine : activateurs de l'hydrolase GCase (Ambrosi *et al.*, Neurobiology of Disease, 2015, McNeill *et al.*, Brain, 2014, Silveira *et al.*, BMC Neurology, 2019)
- ❖ Nanoparticules acides : restauration du pH lysosomal (Bourdenx *et al.*, Autophagy, 2016, Lee *et al.*, Cell reports, 2015, Prévot *et al.*, Bioconjugate Chemistry, 2018)

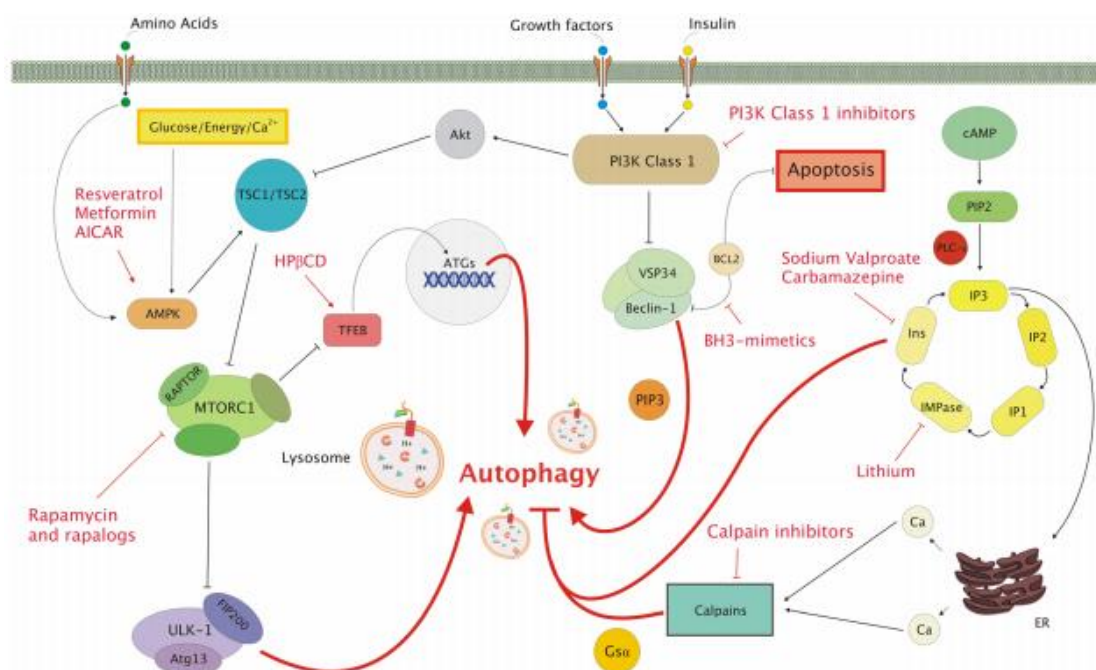


Figure 26 : Les différentes stratégies envisagées pour activer la voie autophagique via l'utilisation de composés chimiques ou naturels. Les voies dépendantes et indépendantes de la voie de MTOR sont envisagées. D'après (Moors *et al.*, Molecular Neurodegeneration, 2017)

En parallèle de l'approche par l'utilisation de composés chimiques ou naturels, la thérapie génique est une stratégie également envisagée pour activer l'autophagie. Ainsi, une surexpression de gènes codant pour le facteur de transcription TFEB (**Decressac *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2013**) ou le récepteur de l'autophagie médiée par les protéines chaperons LAMP2a (**Xilouri *et al.*, Brain, 2013**) a démontré une efficacité thérapeutique dans la clairance de l' α -syn et la diminution de la neurodégénérescence dans des modèles de la MP.

Cibler la restauration autophagique dans les synucléinopathies a été explorée comme stratégie thérapeutique, surtout dans le cadre de la MP, amenant à quelques essais cliniques encore en cours. Aucune étude n'a reporté l'efficacité de telles thérapies sur les autres synucléinopathies comme l'AMS, bien qu'une telle stratégie cible les caractéristiques communes à toutes les synucléinopathies.

Objectifs de la thèse

Comme décrit précédemment dans le chapitre introductif, malgré l'existence de traitements symptomatiques efficaces pour les synucléinopathies, aucune thérapie n'est disponible actuellement pour arrêter ou ralentir le processus neurodégénératif des patients atteints d'une synucléinopathie.

Mon travail de thèse a consisté à mener une approche multifactorielle et translationnelle dédiée à l'étude des synucléinopathies en développant des aspects de modélisation, de mécanistique et thérapeutique. La compréhension mécanistique restant insuffisante, associée avec la complexité des processus cellulaires pléiotropes mis en jeu dans ces pathologies, rendent la recherche d'approches thérapeutiques difficile. Nous nous sommes concentrés sur le dénominateur pathologique commun de ces pathologies que constitue l'accumulation de la protéine α -synucléine pour mener plusieurs travaux de recherche en parallèle. Nous nous sommes ainsi intéressés à : (i) comprendre les phénomènes cellulaires sous-jacents à la neurodégénérescence induite par des formes pathologiques de la protéine α -synucléine ; (ii) cibler la dégradation de la protéine α -synucléine comme stratégie thérapeutique commune à toutes les synucléinopathies ; (iii) disséquer au niveau intra-cellulaire la mécanistique de communication entre deux organites afin de mieux comprendre les effets pléiotropes présents dans les synucléinopathies. Ces trois axes constituent les trois sous-parties qui seront présentées dans la partie Résultat de ce manuscrit. Ainsi, notre cœur d'étude est centré sur la protéine α -synucléine ou ses conséquences au niveau de l'homéostasie cellulaire. En tant qu'acteur pathologique commun au sein des synucléinopathies, elle constitue également une cible de choix pour proposer de futures stratégies thérapeutiques à visée translationnelle.

Tout d'abord, nous avons cherché à disséquer les mécanismes cellulaires sous-jacents impliqués dans la neurodégénérescence induite par l'injection d' α -synucléine agrégée dans l'hypothèse dite « prion-like » dans le cadre des synucléinopathies. Premièrement, nous avons étudié la pertinence d'utiliser des fractions contenant des corps de Lewy purifiés à partir du cortex cingulaire de cerveaux de patients parkinsoniens en tant que nouveau modèle murin de la maladie de Parkinson. Deuxièmement, nous nous sommes intéressés à déterminer les mécanismes cellulaires qui permettent de prédire la neurodégénérescence induite par l' α -synucléine provenant de corps de Lewy purifiés à partir de mésencéphale de cerveaux de patients parkinsoniens dans un modèle primate non-humain de la maladie de Parkinson. Troisièmement, cette même étude nous a permis de tester l'hypothèse concernant l'origine de la pathologie, à savoir le système nerveux central ou entérique. Ces deux projets de recherche réalisés chez le singe nous ont permis d'apporter de

nouveaux mécanismes cellulaires toxiques impliqués dans le processus de neurodégénérescence et de démontrer l'existence d'une route bidirectionnelle de propagation et de la synucléinopathie entre ces deux systèmes nerveux.

Dans une seconde partie, nous nous sommes concentrés sur une stratégie thérapeutique visant à rétablir la fonction autophagique, altérée au sein des synucléinopathies. Cette stratégie a pour but de diminuer les niveaux pathologiques d' α -synucléine dans des modèles rongeurs de la maladie de Parkinson et de l'atrophie multisystématisée à la suite de l'activation de l'autophagie. Pour cela, nous avons utilisé deux pistes d'induction de l'autophagie que constitue la production d'un sucre, le tréhalose, et par l'utilisation d'un vecteur viral pour surexprimer le facteur de transcription TFEB. Ces travaux ont permis de démontrer de façon rigoureuse qu'une activation de la voie autophagique s'avère être une stratégie thérapeutique payante et potentiellement commune à toutes les synucléinopathies.

Dans la dernière partie, nous avons initié une étude ayant pour but de déterminer si une communication existe entre deux organites intracellulaires, le lysosome et le réticulum endoplasmique, physiologiquement ou dans un contexte de synucléinopathie. Ce projet novateur permettra de déterminer son existence, son rôle physiologique ainsi que la possible contribution aux processus cellulaires impliqués dans la neurodégénérescence et/ou la synucléinopathie.

RESULTATS

PARTIE 1 : Etude des mécanismes cellulaires sous-jacents à la neurodégénérescence liée à l' α -synucléine

Projet 1 : Evaluation d'un nouveau modèle murin de synucléinopathie à partir d'inoculation de fractions de corps de Lewy purifiés à partir de tissus post-mortem de cortex cingulaire de patients parkinsoniens

1. Contexte de l'étude :

De multiples modèles animaux permettent aujourd'hui l'étude et la modélisation des synucléinopathies bien que toutes les caractéristiques des synucléinopathies ne soient pas retrouvées dans un seul même modèle. Bien que les modèles à base de toxines tels que le MPTP présentent également une agrégation de l' α -syn notamment chez le primate non-humain (**Kowall et al., NeuroReport, 2000**), la modélisation des synucléinopathies repose aujourd'hui sur trois groupes de modèles selon la méthodologie expérimentale employée pour induire la pathogénicité de la protéine α -syn (**Visanji et al., Trends in Neurosciences, 2016**):

- ❖ des modèles transgéniques qui surexpriment de manière endogène les formes sauvages ou mutées de la protéine α -syn ;
- ❖ des modèles basés sur l'expression virale de la protéine α -syn sauvage ou mutée ;
- ❖ des modèles basés sur l'inoculation de matériel contenant la protéine α -syn pathogénique.

Pour cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à cette dernière catégorie de modélisation pour la synucléinopathie qui s'appuie sur la propriété « prion-like » de transconformation et transmission de l'information pathogénique de la protéine α -syn injectée à l' α -syn endogène. Le matériel inoculé contenant la protéine α -syn pathologique demeure cependant très hétérogène.

D'une part, on retrouve l'utilisation de formes synthétiques d' α -syn pathologique produites en solution telles que les fibres préformées d' α -syn murine ou humaine (**Luk et al., Science, 2012, Masuda-Suzukake et al., Brain, 2013, Volpicelli-Daley et al., Neuron, 2011**), ou les formes recombinantes pures d' α -syn produites dans les systèmes de levure (**Peelaerts et al., Nature, 2015**). L'utilisation de ce matériel reste questionnée par leur origine synthétique mais également par les doses injectées très élevées (de l'ordre du μ g), qui ne sont pas représentatives de la physiopathologie (de l'ordre de ng) (**Iwai et al., 1995**).

D'autre part, on retrouve l'utilisation de matériel biologique provenant de tissus post-mortem humains. Des homogénats totaux de cerveaux provenant de patients atteints de synucléinopathies ont ainsi été utilisés comme inocula pour induire la pathogénicité liée à l' α -syn dans des modèles rongeurs (**Mougenot et al., Neurobiology of Aging, 2012, Watts et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2013**). Cependant, ce matériel est constitué d'un mélange indéfini et non caractérisé de différents types cellulaires, qui rend difficile le suivi et la compréhension de l'origine véritable de

la pathogénicité induite *in vivo*. Une autre approche passe par l'utilisation de fractions de corps de Lewy purifiés provenant de mésencéphales de patients atteints de la maladie de Parkinson. Cette méthodologie a démontré son efficacité à induire une pathogénicité liée à l' α -syn chez la souris et le primate non-humain, avec injection de très faibles doses d' α -synucléine injectée (de l'ordre du pg/ μ L) (**Recasens *et al.*, Ann Neurol, 2014**). La présence de l' α -syn dans ces fractions est indispensable à l'induction pathogénique puisqu'une immunodéplétion au préalable de l' α -syn humaine dans la fraction injectée abroge totalement l'induction du phénotype pathologique chez l'animal. De plus, la présence de l' α -syn endogène murine est nécessaire à l'induction de la pathogénicité puisque le phénotype pathologique est également absent lorsque l'inoculation des fractions de corps de Lewy est effectuée sur des souris knock-out pour le gène *Snca* codant pour la protéine murine α -syn. (**Recasens *et al.*, Ann Neurol, 2014**).

Le problème d'accès à la source du matériel se pose alors pour la reproductibilité de ce modèle de synucléinopathie puisque la quantité de tissus mésencéphaliques de patients atteints de synucléinopathies reste faible et restreinte. Le cortex cingulaire est une région plus grande en terme de volume et où on retrouve la présence de corps de Lewy de manière assez dense (**Sakamoto *et al.*, Experimental Neurology, 2002**), nous nous sommes intéressés à utiliser cette potentielle source de matériel pathologique humain.

2. Objectif de l'étude :

Nous avons voulu évaluer l'effet de l'inoculation de fractions de corps de Lewy provenant du cortex cingulaire de patients parkinsoniens, afin de déterminer si une pathogénicité peut être induite par ce matériel, en comparaison de celle induite par des fibres préformées d' α -syn murine.

3. Design expérimental :

Purification des corps de Lewy :

Le cortex cingulaire est prélevé sur des cerveaux post-mortem humains frais provenant de patients parkinsoniens sporadiques présentant une pathologie avec la présence de corps de Lewy visible au niveau de la substance noire après l'évaluation pathologique. Brièvement, les tissus sont homogénéisés dans 9 fois le volume de tampon froid MSE (10mM MOPS/KOH, pH 7,4, 1M sucrose, 1mM acide tétrahydrique d'éthylène glycol, 1mM éthylène diamine tétraacétique) supplémenté en cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete mini ; Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne) à l'aide d'un potter en verre. Pour la purification des corps de Lewy, un gradient étagé de sucrose est préparé avec une couche de 2,2M au fond puis une couche de 1,4M

puis une couche de 1,2M de sucrose en ratio volumétrique de 3,5:8:8. L'homogénat de tissu est déposé à la surface du gradient puis est soumis à une étape de centrifugation à 4°C à 160 000g pendant 3 heures dans un rotor SW32.1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Vingt-six fractions de 500µL sont ensuite collectées pour chaque gradient du haut vers le bas et la présence d'agrégats d' α -syn est analysée à l'aide d'un Dot-Blot en biochimie. Les fractions contenant l' α -syn agrégée provenant des corps de Lewy de patients parkinsoniens se situent entre les fractions 21 et 23 et sont celles appelées « fractions LB ». Les fractions qui ne contiennent pas l' α -syn agrégée correspondent aux fractions 3 à 5 et sont celles appelées « fractions noLB » et constituent la condition contrôle aux fractions LB.

Des fibres préformées d' α -syn murine synthétiques (PFF) ont également été fournies pour l'étude par le laboratoire du Dr. Virginia Lee et ont été caractérisées précédemment (**Volpicelli-Daley et al., Neuron, 2011**).

Injection stéréotaxique des fractions LB, noLB et des PFF :

Dix-sept souris sauvages C57Bl/6J (Charles Rivers) sont utilisées pour ce projet. Les animaux sont injectés par stéréotaxie unilatéralement dans la substance noire pars compacta droite aux coordonnées suivantes : antérieur -2,9, latéral -1,3, profondeur -4,5. Le volume total d'injection est de 2µL de fractions LB (n=6) et noLB (n=6), et 2µL de PFF à 5µg/µL (n=5). L'hémisphère gauche constitue la condition contrôle. Toutes les procédures expérimentales précédentes ont été approuvées par le Comité d'éthique animale de l'Université de Bordeaux.

Analyse immunohistochimique des cerveaux en post-mortem

Les animaux ont été mis à mort cinq mois après la chirurgie. Les cerveaux ont été prélevés puis congelés après fixation pour une analyse histologique.

Neurodégénérescence : la perte neuronale dopaminergique est évaluée grâce à un marquage tyrosine hydroxylase (TH, EP1532Y, abcam, #ab137869), suivi d'un comptage par stéréologie des neurones de la substance noire pars compacta positifs pour la TH ainsi qu'une analyse par densité optique de la quantité des fibres dopaminergiques au sein du striatum.

Synucléinopathie : l'accumulation de l' α -syn est évaluée dans la substance noire et le striatum des animaux. Brièvement, des sections de striatum (antérieur, médian, postérieur) et de la substance noire sont incubées avec des anticorps primaires ciblant : l' α -syn murine totale (BD Biosciences, Syn-1, #610787), l' α -syn murine résistante au traitement à la protéinase K (10 min à température ambiante, 1µg/µL), l' α -syn phosphorylée à la sérine 129 (Wako, clone #64, # 015-25191).

Réaction inflammatoire : La neuroinflammation de type microgliale a ensuite été évaluée par un marquage au niveau de la substance noire et du striatum avec le marqueur microgliale Iba1 (abcam, # ab178846) mesuré par densité optique.

4. Résultats :

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'évaluation de la neurodégénérescence induite par l'inoculation de fractions LB (GC-LB), noLB (GC-NoLB) provenant de cortex cingulaire de patients parkinsoniens, ou de fibres préformées d' α -syn murine (PFF) dans la substance noire des souris (**Figure 27**).

Nous n'avons observé aucune perte significative dopaminergique au niveau du nombre de neurones TH-positifs dans la substance noire des souris inoculées, pour les trois conditions, comparé au côté controlatéral (**Figure 27A**). Néanmoins, le pourcentage de perte neuronale dopaminergique est plus important (25%) pour les souris injectées avec des fractions LB comparé aux conditions fractions noLB et PFF (**Figure 27B**).

En ce qui concerne le striatum, une perte significative au niveau des fibres dopaminergiques striatales est observée uniquement pour le groupe injecté avec les fractions LB (12%) (**Figure 27C-D**).

Ces résultats suggèrent que l'inoculation de fractions LB provenant de cortex cingulaire de patients parkinsoniens, qui contiennent l' α -syn pathologique agrégée, n'induit qu'une faible toxicité au niveau des corps cellulaires dopaminergiques nigraux et des fibres dopaminergiques striatales. L'inoculation de fractions noLB provenant de cortex cingulaire, qui ne contiennent pas d' α -syn pathologique agrégée, n'induit pas de neurotoxicité dopaminergique. Enfin, une inoculation avec des fibres synthétiques préformées d' α -syn murine ne semble pas induire d'effet neurodégénératif chez des souris sauvages.

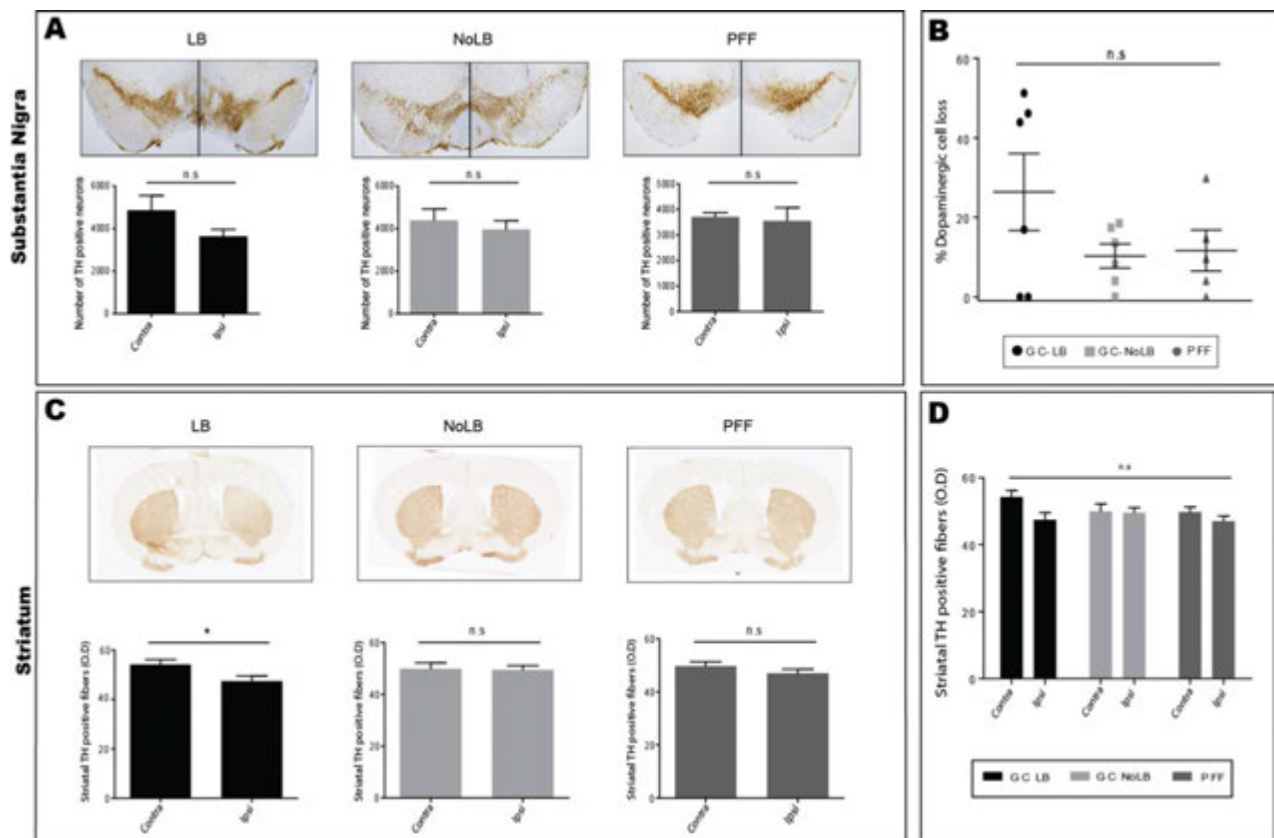


Figure 27 : Evaluation de la neurodégénérescence nigro-striatale induite par l'inoculation de fractions LB (GC-LB) et noLB (GC-NoLB) provenant du cortex cingulaire de patients parkinsoniens ou de fibres préformées d' α -synucléine (PFF) dans la substance noire de souris sauvages. (A) Images illustratives (haut) et quantification (bas) du nombre de neurones TH-positifs dans la substance noire ipsilatérale et controlatérale des souris inoculées. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un t-test non-paramétrique. (B) Pourcentage de perte neuronale observée dans la substance noire des souris inoculées entre les différents groupes expérimentaux. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA. (C) Images illustratives (haut) et quantification (bas) de l'immunoréactivité des fibres TH-positives dans le striatum ipsilatéral et controlatéral des souris inoculées (O.D : densité optique). Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un t-test non-paramétrique. (D) Comparaison entre tous les groupes expérimentaux de la quantité de fibres dopaminergiques TH-positives dans le striatum des souris inoculées. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test two-way ANOVA. * $p < 0.05$, n.s : non significatif.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'évaluation de la synucléinopathie induite après l'inoculation de fractions LB (GC-LB) et noLB (GC-NoLB) provenant de cortex cingulaire de patients parkinsoniens, ou de fibres préformées d' α -syn murine (PFF) dans la substance noire des souris sauvages. Pour cela, nous avons tout d'abord effectué une analyse histochimique de la quantité d' α -syn murine avec ou sans pré-traitement à la protéinase K dans la substance noire des animaux inoculés (**Figure 28**). Nous n'avons détecté aucune accumulation d' α -syn induite au niveau ipsilatéral après inoculation d' α -syn pathogénique provenant des fractions LB, noLB ou des PFF en comparaison au côté controlatéral, avec ou sans traitement à la protéinase K (**Figure**

28A-B). Nous avons confirmé l'efficacité du traitement à la protéinase K utilisé, comme démontré par la diminution de la quantité d' α -syn endogène après traitement à la protéinase K (+PK) par rapport à la condition sans traitement (-PK) (**Figure 28C**). Le pourcentage de formes α -syn résistantes à la protéinase K, donc agrégées, est inchangé entre les trois conditions expérimentales d'inoculation (**Figure 28D**).

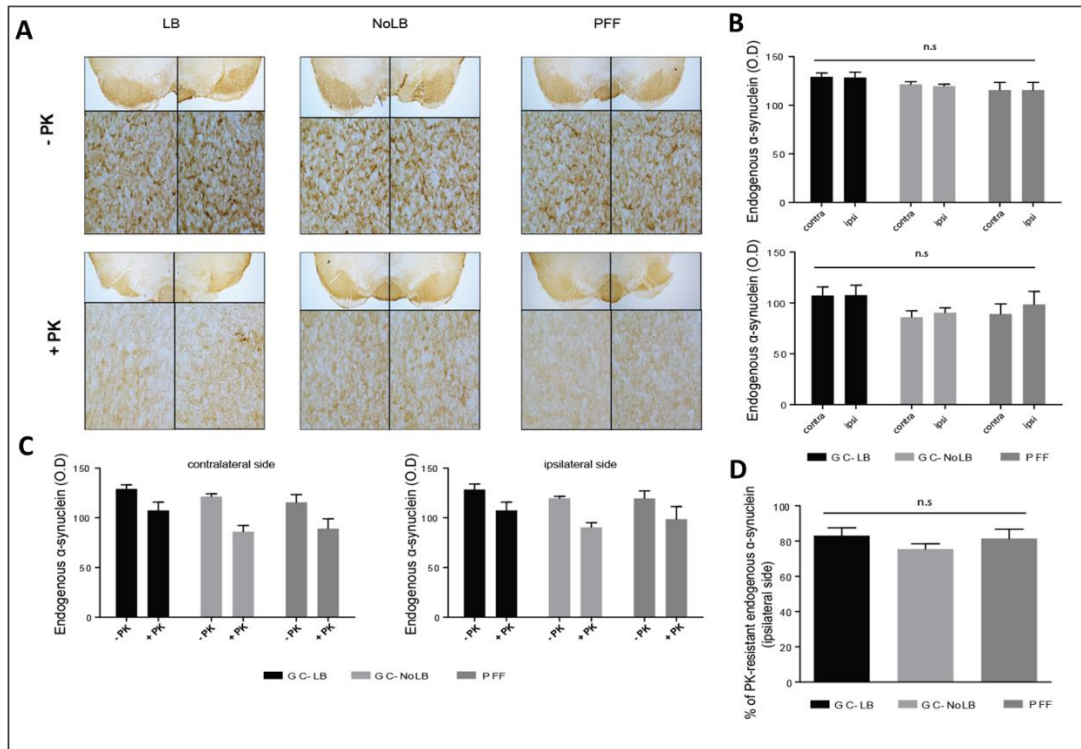


Figure 28 : Evaluation de la synucléinopathie nigrale après inoculation de fractions LB (GC-LB) et noLB (GC-NoLB) provenant du cortex cingulaire de patients parkinsoniens ou de fibres préformées d' α -synucléine (PFF) dans la substance noire de souris sauvages. (A) Images illustratives et (B) quantification de la quantité d' α -synucléine endogène dans la substance noire ipsilatérale et controlatérale des souris inoculées, avec (+PK) ou sans (-PK) traitement à la protéinase K. O.D : densité optique. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test two-way ANOVA. (C) Quantification de l'effet du traitement à la protéinase K dans la substance noire ipsilatérale et controlatérale des souris inoculées. (D) Pourcentage de formes d' α -synucléine résistantes à la protéinase K dans la substance noire des souris inoculées. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA. n.s : non significatif.

De même, au niveau du striatum, aucune accumulation d' α -syn induite au niveau ipsilatéral après inoculation d' α -syn pathogénique provenant des fractions LB, noLB ou des PFF en comparaison au côté controlatéral, avec ou sans traitement à la protéinase K, n'est observée (**Figure 29A-B**). Nous avons également confirmé l'efficacité du traitement à la protéinase K utilisé, comme démontré par la diminution de la quantité d' α -syn endogène après traitement à la protéinase K

(+PK) par rapport à la condition sans traitement (-PK) (**Figure 29C**). Le pourcentage de formes α -syn résistantes à la protéinase K, donc agrégée, est plus important au niveau du striatum des souris ayant reçu les PFF comparé aux animaux inoculés avec les fractions du cortex cingulaire (**Figure 29D**).

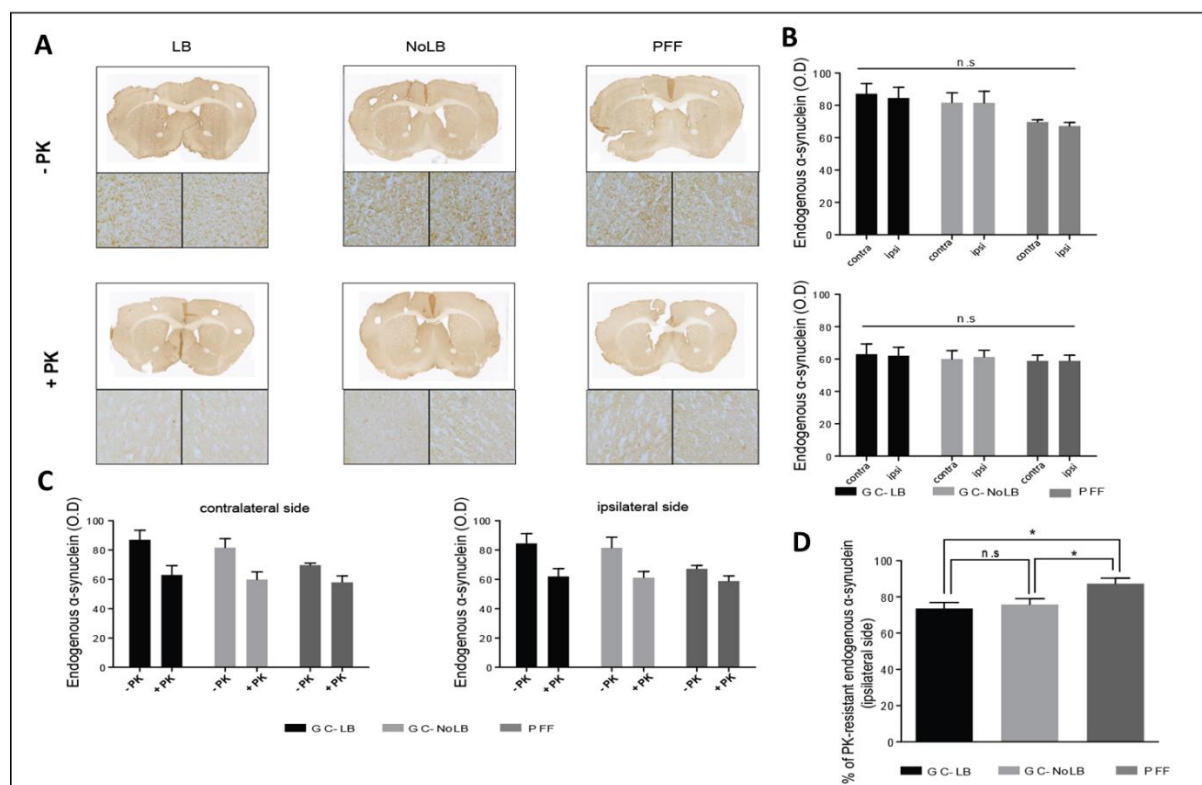


Figure 29 : Evaluation de la synucléinopathie striatale après inoculation de fractions LB (GC-LB) et NoLB (GC-NoLB) provenant du cortex cingulaire de patients parkinsoniens ou de fibres préformées d' α -synucléine (PFF) dans la substance noire de souris. (A) Images illustratives et (B) quantification de la quantité d' α -synucléine endogène dans le striatum ipsilatéral et controlatéral des souris inoculées, avec (+PK) ou sans (-PK) traitement à la protéinase K. O.D : densité optique. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test two-way ANOVA. (C) Quantification de l'effet du traitement à la protéinase K dans le striatum ipsilatéral et controlatéral des souris inoculées. (D) Pourcentage de formes d' α -synucléine résistantes à la protéinase K dans le striatum des souris inoculées. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA. n.s : non significatif.

Nous avons ensuite considéré la présence d' α -syn pathogénique dans les souris inoculées au niveau nigrale avec les fractions LB (GC-LB) et NoLB (GC-NoLB) provenant de cortex cingulaire de patients parkinsoniens, ou les fibres préformées d' α -syn murine (PFF). Pour cela, une analyse histochemique de la phosphorylation de l' α -syn endogène à la sérine 129 a été effectuée (**Figure 30**). Nous n'avons détecté aucune accumulation de formes phosphorylées d' α -syn endogène dans

le côté injecté comparé au côté non-injecté pour les trois conditions, que ce soit au niveau de la substance noire ou du striatum des souris inoculées (**Figure 30**).

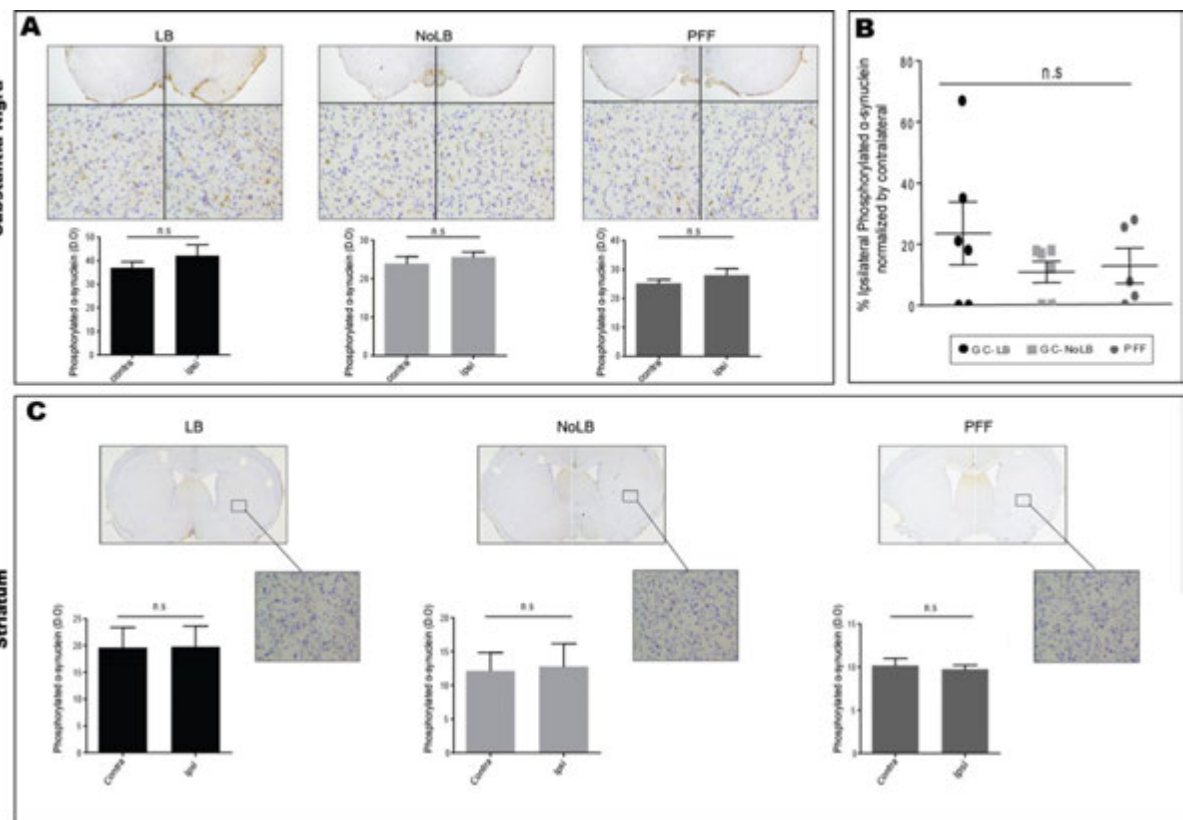


Figure 30 : Evaluation de l'occurrence de la phosphorylation nigro-striée après inoculation de fractions LB (GC-LB) et NoLB (GC-NoLB) provenant du cortex cingulaire de patients parkinsoniens ou de fibres préformées d'α-synucléine (PFF) dans la substance noire de souris. (A) Images illustratives et quantification de la quantité d'α-synucléine endogène phosphorylée dans la substance noire ipsilatérale et controlatérale des souris inoculées. O.D : densité optique. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test t-test non-paramétrique. **(B)** Pourcentage des formes d'α-synucléine phosphorylée dans la substance noire des souris inoculées. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA. **(C)** Images illustratives et quantification de la quantité d'α-synucléine endogène phosphorylée dans le striatum ipsilatéral et controlatéral des souris inoculées. O.D : densité optique. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test t-test non-paramétrique. n.s : non significatif.

Ces résultats suggèrent que l'α-syn exogène humaine pathologique contenue dans les fractions LB ou les PFF n'induit pas de pathogénicité, du moins par la phosphorylation en S129 de l'α-syn endogène murine.

Enfin, nous avons analysé la réaction inflammatoire de type microgliale, décrite comme étant un acteur des processus de neurodégénérescence. Pour cela, nous avons mené une analyse

histochimique en utilisant le marqueur microgliale Iba1 dans la substance noire et le striatum des souris inoculées au niveau nigral avec les fractions LB (GC-LB), NoLB (GC-NoLB) provenant de cortex cingulaire de patients parkinsoniens, ou les fibres préformées d' α -syn murine (PFF) (**Figure 31**). Nous n'avons détecté aucune différence significative concernant la réaction inflammatoire microgliale dans le côté ipsilatéral comparé au controlatéral nigral (**Figure 31A**) ou striatal (**Figure 31C-D**) pour les trois conditions étudiées. Cependant, en comparant la réaction inflammatoire microgliale induite par les différents inocula au niveau de la substance noire injectée, nous avons mis en évidence une réaction microgliale accrue après injection d' α -syn pathologique contenue dans les fractions LB ou les PFF, comparé à l'inoculation de fractions ne contenant pas d' α -syn pathologique (**Figure 31B**).

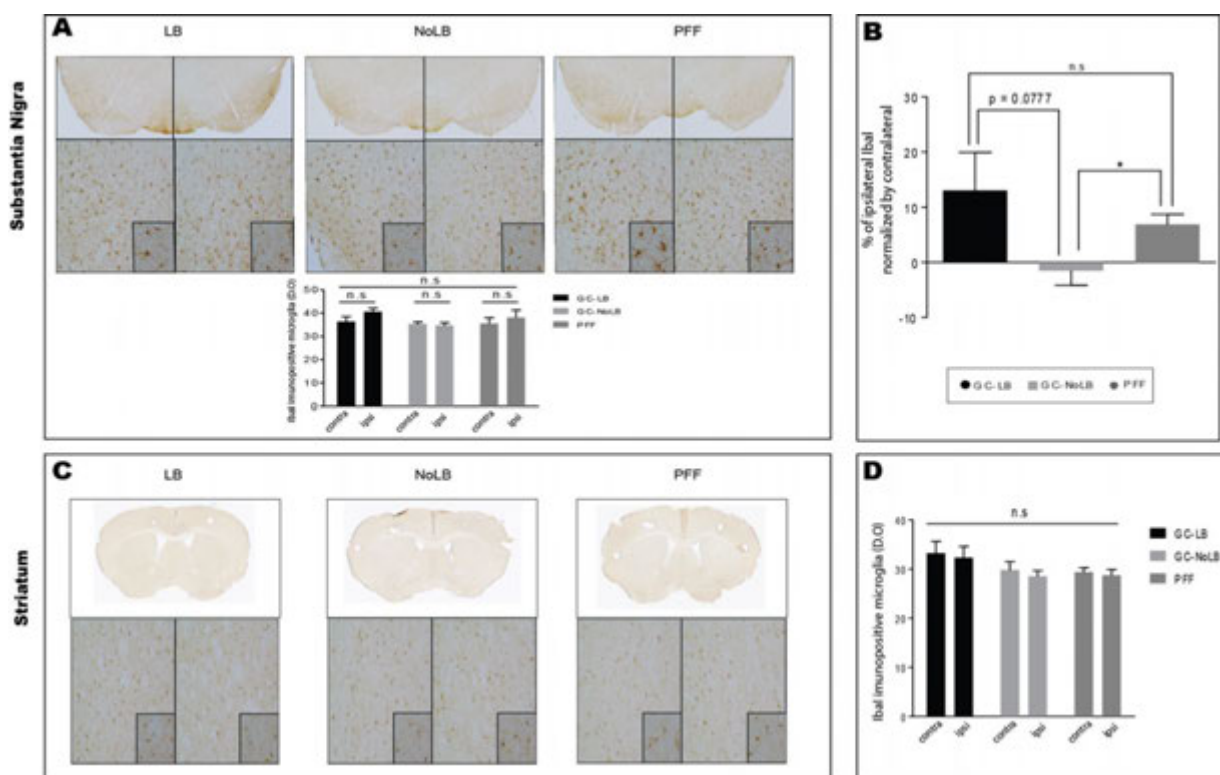


Figure 31 : Evaluation de la réaction inflammatoire microgliale nigro-striée après inoculation de fractions LB (GC-LB) et NoLB (GC-NoLB) provenant du cortex cingulaire de patients parkinsoniens ou de fibres préformées d' α -synucléine (PFF) dans la substance noire de souris. (A) Images illustratives et quantification de la quantité de microglie Iba1-positive dans la substance noire ipsilatérale et controlatérale des souris inoculées. O.D : densité optique. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test t-test non-paramétrique et d'un test one-Way ANOVA. (B) Pourcentage de microglie immunoréactive pour Iba1 dans la substance noire des souris inoculées. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA. (C) Images illustratives et (D) quantification de la quantité de microglie Iba1-positive dans le striatum ipsilatéral et controlatéral des souris inoculées. O.D: densité optique. Les

comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA. n.s : non significatif.

5. Discussion de l'étude :

Nous avons tout d'abord confirmé que l'inoculation des fractions noLB provenant de cortex cingulaire de patients parkinsonien chez la souris n'induit aucune neurodégénérescence, synucléinopathie ou phénomène neuroinflammatoire microgliale, comme démontré précédemment dans la littérature pour les fractions noLB provenant de mésencéphale (**Recasens *et al.*, Ann Neurol, 2014**).

De manière surprenante, l'inoculation de fractions LB provenant de cortex cingulaire de patients parkinsoniens dans la substance noire induit seulement une faible toxicité dopaminergique (25% et 12% de perte au niveau nigrale et striatale, respectivement) et nous n'avons pas pu observer d'induction de synucléinopathie de l' α -syn endogène dans les protocoles testés. En comparaison à la pathogénicité induite par l'inoculation de fractions LB provenant de mésencéphale de patients parkinsoniens dans la substance noire de souris, ce résultat suggère que l' α -syn contenue dans les corps de Lewy du cortex cingulaire est moins toxique, pour une même concentration en pg/ μ l d' α -syn que celle présente dans les corps de Lewy provenant du mésencéphale (**Figure 32**). Ce résultat a été suggéré également dans la littérature (**Sakamoto *et al.*, Experimental Neurology, 2002**). L' α -syn contenue dans les corps de Lewy du cortex cingulaire semble également moins toxique que celle présente dans les corps de Lewy de l'amygdale (**Figure 32**). Cet effet différentiel peut être expliqué par une composition différente en agrégats selon la région d'origine, que ce soit au niveau de l'état conformationnel de la protéine α -synucléine, de son état pathogénique (notamment sa phosphorylation) ou bien au niveau des protéines co-facteurs agrégatives. Des études de caractérisation complète structurale et protéomique de ces agrégats pourraient permettre d'élucider cette question.

Ainsi, le choix de l'origine des fractions de corps de Lewy purifiées provenant des patients atteints de la maladie de Parkinson dans la modélisation des synucléinopathies est une donnée importante. En conclusion, le modèle étudié dans ce projet apparaît être un modèle avec ses limites dans le cadre de la modélisation des synucléinopathies.

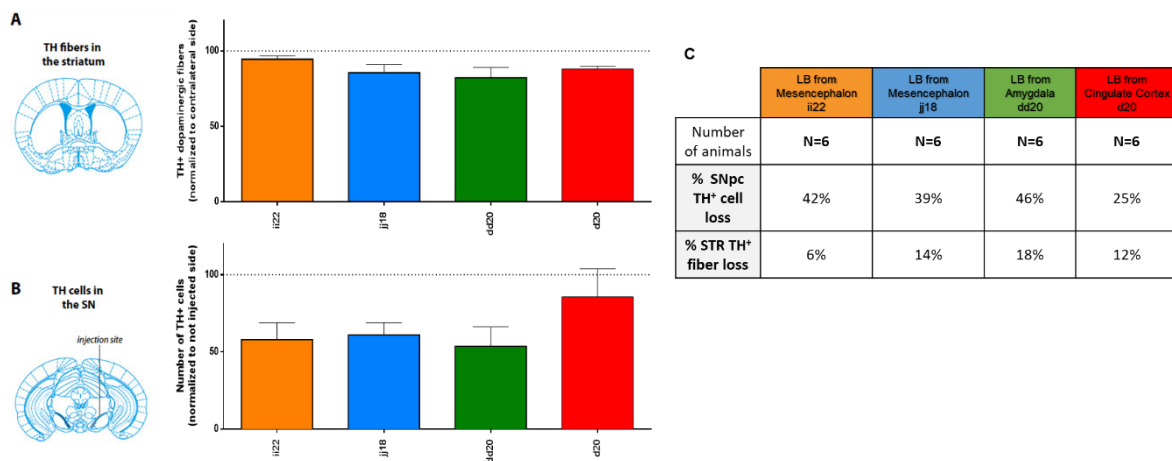


Figure 32 : Comparaison de la neurodégénérescence induite après inoculation de corps de Lewy provenant de différentes régions de cerveaux parkinsoniens. (A) Neurodégénérescence des fibres dopaminergiques du striatum (B) Neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire (C) Pourcentage de neurodégénérescence nigrale et striatale. Orange : fraction 22 de corps de Lewy provenant du mésencéphale du patient parkinsonien #ii. **Bleue :** fraction 18 de corps de Lewy provenant du mésencéphale du patient parkinsonien #jj. **Vert :** fraction 20 de corps de Lewy provenant de l’amygdale du patient parkinsonien #dd, **Rouge :** fraction 20 de corps de Lewy provenant du cortex cingulaire du patient parkinsonien #d (utilisé dans cette étude).

De plus, au cours de cette étude, l’inoculation des PFF d’ α -syn murine provenant de ce même groupe dans la substance noire des souris n’a montré aucune induction de la synucléinopathie ni neurodégénérescence, contrairement à l’injection de fibres préformées d’ α -synucléine murines dans le striatum de souris sauvage (Luk *et al.*, *Science*, 2012, Volpicelli-Daley *et al.*, *Neuron*, 2011). On peut émettre l’hypothèse que l’injection striatale de ces formes synthétiques induit d’abord une perte des fibres dopaminergiques striatales avant une atteinte des corps cellulaires dopaminergiques nigraux, induisant ainsi une neurodégénérescence et la propagation de la synucléinopathie dès 5 mois post-injection. Au contraire, une injection nigrale de ce même matériel ne permet pas d’observer un tel effet à ce temps post-injection, suggérant que l’atteinte directe des neurones dopaminergiques requiert des temps d’inoculation plus longs ou des mécanismes pathologiques différents.

6. Conclusion de l’étude :

Les études ultérieures nécessitent de prendre en considération différents facteurs lors de l’utilisation de fractions de corps de Lewy provenant de patients parkinsoniens pour modéliser la synucléinopathie : la pathologie propre à chaque patient, le choix de la fraction extraite, la structure de la protéine α -syn dans ces fractions mais également la région de provenance des fractions.

Concernant l'utilisation de matériel synthétique contenant l' α -syn pathologique, l'effet toxique induit à l'animal semble dépendant de la conformation de la protéine, la concentration utilisée, le laboratoire de production et le site d'injection.

Aucun modèle actuel de la synucléinopathie ne regroupe entièrement les caractéristiques pathologiques mais un choix explicite et une caractérisation précise du matériel d'induction de la pathologie semblent indispensables pour permettre la reproductibilité des données et la démonstration rigoureuse à la question portée par chaque étude.

Projet 2 : Evaluation des mécanismes sous-jacents impliqués dans la neurodégénérescence induite par l' α -synucléine dans un modèle primate non-humain de maladie de Parkinson.

Machine learning reveals pathological signatures induced by patient-derived α -synuclein structures

Authors : Mathieu Bourdenx^{1,2,†,§}, Aurelien Nioche^{1,2,3,4,†}, Sandra Dovero^{1,2,†}, **Marie-Laure Arotcarena**^{1,2,†}, Sandrine Camus^{1,2}, Gregory Porras^{1,2}, Marie-Laure Thiolat^{1,2}, Nicolas P. Rougier^{1,2,5}, Alice Prigent⁶, Philippe Aubert⁶, Sylvain Bohic⁷, Christophe Sandt⁸, Florent Laferrière^{1,2}, Evelyne Doudnikoff^{1,2}, Niels Kruse⁹, Brit Mollenhauer⁹, Salvatore Novello^{10,11}, Michele Morari^{10,11}, Thierry Leste-Lasserre¹², Inés Trigo Damas^{13,14}, Michel Goillandeau^{1,2}, Celine Perier^{14,15}, Cristina Estrada^{16,17}, Nuria Garcia-Carrillo¹⁸, Ariadna Recasens^{14,15}, Nishant N. Vaikath¹⁹, Omar M. A. El-Agnaf¹⁹, Maria Trinidad Herrero^{16,17}, Pascal Derkinderen⁶, Miquel Vila^{14,15,20,21}, Jose. A. Obeso^{13,14}, Benjamin Dehay^{1,2,*#} and Erwan Bezard^{1,2,*#}

† Ces auteurs ont contribué de manière équivalente à ce travail.

Revised manuscript under review.

L'utilisation d' α -syn synthétique agrégée ou de matériel humain tel que les fractions de corps de Lewy contenant l' α -syn pathogénique agrégée provenant de mésencéphales de cerveaux de patients parkinsoniens ont démontré leur capacité à induire la synucléinopathie chez l'animal inoculé (**Recasens *et al.*, Cell and Tissue Research, 2018**). La présence de la protéine α -syn sous forme agrégée au sein des fractions de corps de Lewy est indispensable à l'induction de la pathogénicité de la synucléinopathie induite chez la souris sauvage (**Recasens *et al.*, Ann Neurol, 2014**). L'injection de ces mêmes fractions de corps de Lewy dans le striatum ou la substance noire de deux singes rhésus macaques induit également une neurodégénérescence associée à une accumulation d' α -synucléine se propageant dans différentes zones du système nerveux et à la présence d' α -syn phosphorylée à la sérine 129 (**Recasens *et al.*, Ann Neurol, 2014**).

Cette étude a eu pour but de déterminer les mécanismes biologiques sous-jacents à l'origine de la neurodégénérescence induite par l' α -syn dans un modèle primate non-humain de la maladie de Parkinson. L'hypothèse « prion-like » de l' α -syn décrite dans la seconde partie introductive de ce manuscrit suggère que la protéine α -syn, sous sa forme pathogénique, telle qu'elle est présente dans les corps de Lewy, initie une cascade d'évènements cellulaires amenant à la mort cellulaire.

Afin de répondre à cette question, nous avons mené une analyse exploratoire sur une cohorte de 49 babouins (*Papio papio*), terminés à différents temps, en mesurant 180 variables par des approches de biochimie, d'histochimie, d'analyse éthologique, d'analyse d'expression génique, de mesure de protéines par des méthodes ELISA et des mesures de métaux lourds (**Figure 33**).

Groupe	Inocula	Site d'injection	Durée d'inoculation (mois)	Nombre d'animaux
A	-	-	6	7
B	Fractions LB	Striatum	6, 12 et 24	6*3
C	Fractions noLB	Striatum	6, 12 et 24	4*3
D	Fractions LB	Cortex	12	5
E	Fractions GCI	Striatum	24	5
F	Fractions LB	Paroi ventrale de l'estomac	24	5

Figure 33 : Groupes d'expérience de l'étude sur la cohorte de 49 babouins. Fractions LB : fractions contenant l' α -synucléine pathologique agrégée (insoluble) de corps de Lewy provenant de mésencéphale de patients parkinsoniens. Fractions noLB : fractions contenant l' α -synucléine soluble et faiblement agrégée provenant de mésencéphale de patients parkinsoniens. Fractions GCI : fractions contenant l' α -synucléine pathologique agrégée d'inclusions gliales cytoplasmiques provenant de mésencéphales de patients atteints d'AMS.

L'article, présenté ici, ne concerne qu'une partie de ce projet de grande échelle et se concentre seulement sur trois groupes expérimentaux que sont :

- ❖ Groupe A : un groupe contrôle de singes non injectés (n=7)
- ❖ Groupe B : un groupe de singes ayant reçu une injection bilatérale de fractions contenant l' α -synucléine pathologique agrégée insoluble (90% de formes agrégées) de corps de Lewy provenant de mésencéphale de patients parkinsoniens, appelé groupe LB (n=6)
- ❖ Groupe C : un groupe de singe ayant reçu une injection bilatérale de fractions contenant l' α -synucléine soluble et faiblement agrégée (10% de formes agrégées seulement) provenant de mésencéphale de patients parkinsoniens, appelé groupe noLB (n=4).

De plus, ce projet se concentre uniquement sur l'étude des animaux à 24 mois post-injection.

Nous avons tout d'abord confirmé une neurodégénérescence nigro-striée induite par la présence d' α -syn agrégée présente dans le groupe LB. De manière inattendue, un phénomène de neurodégénérescence a également été induit par la présence d' α -syn peu agrégée dans le groupe noLB. Au vu du nombre important de variables mesurées, nous avons choisi d'adopter une approche computationnelle par machine-learning afin de déterminer les variables biologiques (en variables d'entrée) qui prédisent le mieux le phénomène de neurodégénérescence (en variable de sortie) observé chez ces animaux. Nous avons ainsi pu ressortir les 20 premières variables qui constituent les meilleurs prédicteurs de la neurodégénérescence liée à l' α -syn pour les deux

groupes de traitement. Nous avons pu mettre en évidence une signature spécifique et différente entre les groupes LB et noLB, mettant en lumière différents processus biologiques impliqués dans le phénomène de neurodégénérescence pour chaque condition. La signature du groupe LB est caractérisée par des variables de mesure de changements de l' α -syn dans les zones corticales, notamment les niveaux de phosphorylation de la protéine, ainsi que des variables décrivant des dysfonctions neurochimiques au niveau des structures de sortie des noyaux de la basal ganglia, notamment les taux de GABA dans le globus pallidus interne. Concernant le groupe noLB, les meilleurs prédicteurs sont plus diversifiés et regroupent le taux de zinc dans la substance noire, les variables liées à l'agrégation de l' α -syn et celles liées aux processus de dégradation protéique. Cette étude a donc permis de confirmer l'intérêt d'étudier des paramètres cellulaires déjà reconnus dans le domaine mais également de mettre à jour de nouveaux processus biologiques inattendus impliqués dans la neurodégénérescence dopaminergique liée à l' α -syn.

En conclusion, nous avons premièrement démontré une spécificité d'espèce concernant l'inocula utilisée puisque la fraction dite noLB s'avère pathologique chez le primate non-humain alors qu'elle n'induisait aucun phénotype pathologique chez la souris. Ceci soulève l'intérêt des études translationnelles avec l'utilisation en première instance des modèles rongeurs avant une validation par des modèles supérieurs tels que le primate non-humain. Deuxièmement, nous avons mis en évidence une signature pathologique spécifique, dépendante de l'état conformationnel de l' α -syn, dans l'induction des mécanismes cellulaires à l'origine de la neurodégénérescence. Cette étude apporte aussi une preuve de concept de l'utilisation d'une approche par machine-learning dans l'analyse d'un set important de données biologiques dans le cadre de la maladie de Parkinson, permettant de confirmer ou de mettre en lumière de nouveaux processus.

Une étude de la cinétique de neurodégénérescence et l'évolution des signatures de chacun des groupes d'expérience par l'analyse en machine-learning des données collectées pour ces mêmes groupes à 6 et 12 mois post-injection est à ce jour en cours.

De même, le projet se poursuit par l'étude du groupe ayant reçu les fractions LB au niveau cortical ou celui ayant reçu les fractions d'inclusions gliales cytoplasmiques provenant de patients atteints d'AMS.

Toutes ces études donneront lieu à des publications futures.

Identification of distinct pathological signatures induced by patient-derived α -synuclein structures in non-human primates

Authors : M. Bourdenx^{1,2,†,‡}, A. Nioche^{1,2,3,4,†}, S. Dovero^{1,2,†}, M.-L. Arotcarena^{1,2,†}, S. Camus^{1,2}, G. Porras^{1,2}, M.-L. Thiolat^{1,2}, N. P. Rougier^{1,2,5}, A. Prigent⁶, P. Aubert⁶, S. Bohic⁷, C. Sandt⁸, F. Laferrière^{1,2}, E. Doudnikoff^{1,2}, N. Kruse⁹, B. Mollenhauer⁹, S. Novello^{10,11}, M. Morari^{10,11}, T. Leste-Lasserre¹², I. Trigo Damas^{13,14}, M. Goillandeau^{1,2}, C. Perier^{14,15}, C. Estrada^{16,17}, N. Garcia-Carrillo¹⁸, A. Recasens^{14,15}, N. N. Vaikath¹⁹, O. M. A. El-Agnaf¹⁹, M. Trinidad Herrero^{16,17}, P. Derkinderen⁶, M. Vila^{14,15,20,21}, J. A. Obeso^{13,14}, B. Dehay^{1,2,* §} and E. Bezard^{1,2,*§}

Affiliations:

¹ Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France;

² CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France;

³ Institut Jean Nicod, Département d'études cognitives, ENS, EHESS, PSL Research University, 75005 Paris, France;

⁴ Institut Jean Nicod, Département d'études cognitives, CNRS, UMR 8129;

⁵ INRIA Bordeaux Sud-Ouest, 33405 Talence, France;

⁶ Inserm, U913, Nantes F-44035, France; Nantes University, Nantes F-44035, France; CHU Nantes, Department of Neurology, Nantes F-44093, France;

⁷EA-7442 Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale, RSRM, University of Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France ;

⁸ SMIS beamline, Synchrotron SOLEIL, l'orme des merisiers, 91192 Gif sur Yvette, France; ⁹Paracelsus-Elena-Klinik, Kassel, Germany; University Medical Center Goettingen, Institute of Neuropathology, Goettingen, Germany;

¹⁰Department of Medical Sciences, Section of Pharmacology, University of Ferrara, via Fossato di Mortara 17-19, 44121 Ferrara, Italy;

¹¹Neuroscience Center and National Institute of Neuroscience, University of Ferrara, via Fossato di Mortara 17-19, 44121 Ferrara, Italy;

¹²INSERM, Neurocentre Magendie, U1215, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, F-33000 Bordeaux, France;

¹³HM CINAC, HM Puerta del Sur and CEU-San Pablo University Madrid, E-28938 Mostoles, Spain;

¹⁴Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Instituto Carlos III, Spain;

36 ¹⁵Neurodegenerative Diseases Research Group, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR)-Center for Networked
37 Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Barcelona, Spain;

38 ¹⁶Clinical and Experimental Neuroscience Unit, School of Medicine, Biomedical Research Institute of Murcia
39 (IMIB), University of Murcia, Campus Mare Nostrum, 30071 Murcia, Spain;

40 ¹⁷Institute of Research on Aging, School of Medicine, University of Murcia, 30071 Murcia, Spain;

41 ¹⁸Centro Experimental en Investigaciones Biomédica (CEIB), Universidad de Murcia, Murcia, Spain;

42 ¹⁹Neurological Disorders Research Center, Qatar Biomedical Research Institute (QBRI), Hamad Bin Khalifa
43 University (HBKU), Education City, Qatar;

44 ²⁰Department of Biochemistry and Molecular Biology, Autonomous University of Barcelona (UAB),
45 Barcelona, Spain;

46 ²¹Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Barcelona, Spain.
47

48 *To whom correspondence should be addressed to: Dr. Benjamin Dehay and to Dr. Erwan Bezar, Institute of
49 Neurodegenerative Diseases, Université de Bordeaux, CNRS UMR 5293, Centre Broca Nouvelle-Aquitaine,
50 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. E-mail: benjamin.dehay@u-bordeaux.fr (B.D.) and
51 erwan.bezard@u-bordeaux.fr (E.B.)

52 † These authors contributed equally to this work

53 § BD and EB are co-last authors

54 ‡ Present address: Albert Einstein College of Medicine. Department of Developmental and Molecular Biology.
55 1300 Morris Park Ave. Bronx, NY, 10461, USA.

56

57 **Manuscript information:** 44 text pages; 6 figures; 7 supplementary figures; 2 supplementary
58 tables; Machine Learning Code: 10.5281/zenodo.1240558; Raw data: Table S2

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69 **ABSTRACT**

70 Dopaminergic neuronal cell death, associated with intracellular α -synuclein (α -syn)-rich protein
71 aggregates (termed ‘Lewy bodies’), is a well-established characteristic of Parkinson’s disease.
72 Much evidence, accumulated from multiple experimental models has suggested that α -syn plays a
73 role in PD pathogenesis, not only as a trigger of pathology but also as a mediator of disease
74 progression through pathological spreading. Here we have used a machine learning-based
75 approach to identify unique signatures of neurodegeneration in monkeys induced by distinct α -syn
76 pathogenic structures derived from PD patients. Unexpectedly, our results show that, in non-
77 human primates, a small amount of singular α -syn aggregates is as toxic as larger amyloid fibrils
78 present in the LBs, thus reinforcing the need for preclinical research in this species. Furthermore,
79 our results provide evidence supporting the true multifactorial nature of PD as multiple causes can
80 induce similar outcome regarding dopaminergic neurodegeneration.

81

82

83 **INTRODUCTION**

84 The seminal work of Braak and colleagues suggesting that Lewy body (LB) pathology follows a
85 predictable pattern of progression within the brain in Parkinson's disease (PD) (1) as well as the
86 'host-to-graft' observation (2-4) led to the development of experimental models based on
87 injection with α -synuclein (α -syn – the primary protein component of LB) assemblies (5-7).
88 These experimental models suggest that α -syn, in pathological conformations such as the one
89 found in LBs, initiates a cascade of events leading to dopaminergic neuron degeneration as well
90 as cell-to-cell propagation of α -syn pathology through a self-templating mechanism.

91 Several studies have suggested that pre-fibrillar oligomers may represent one of the major
92 neurotoxic entities in PD (8, 9). This notion has been derived primarily from studies using large
93 doses of recombinant α -syn applied to cell cultures or injected into adult mice, over-expressing
94 either mutant or wild-type α -syn (10). In agreement with these findings, we have shown that
95 intracerebral injection of low doses of α -syn-containing LB extracts, purified from the substantia
96 nigra, pars compacta (SNpc) of postmortem PD brains, promotes α -syn pathology and
97 dopaminergic neurodegeneration in wild-type mice and non-human primates (11). Importantly,
98 this neuropathological effect was directly linked to the presence of α -syn in LB extracts, since
99 immuno-depletion of α -syn from the LB fractions prevented the development of pathology
00 following injection into wild-type mice.

01 In this study, our aim was to thoroughly investigate this experimental model of synucleinopathy
02 in non-human primates. The initial study design was to administrate fractions derived from the
03 same PD patients containing either soluble and small α -syn aggregates (hereafter named noLB) or
04 LB-type aggregates (hereafter named LB). However, because of the unexpected finding that non-
05 human primates, unlike mice, are susceptible to soluble or finely granular α -syn, we sought to
06 elucidate the response characteristics induced by either LB or noLB fractions. To achieve a
07 thorough analysis of these α -syn-related characteristics, we took advantage of the strength of
08 machine-learning algorithms for discovering fine patterns among complex sets of data and
09 developed a new method compatible with the constraints of experimental biology. We here report
10 the identification of primate-specific responses to selected α -syn assemblies associated with
11 different pathogenic mechanisms. Overall, our results support the concept of the multifactorial
12 nature of synucleinopathies.

13

14

15 RESULTS

16 *Purification and characterization of α -synuclein extracts from PD patients*

17 NoLB and LB fractions were obtained from the SNpc of five sporadic PD brains exhibiting
18 conspicuous LB pathology. The samples were processed through differential ultracentrifugation
19 in a sucrose gradient, and analyzed for the presence of α -syn aggregates by filter retardation assay
20 (Fig. 1A) (11). Further characterization of noLB and LB fractions was performed by co-
21 localization of α -syn and the amyloid dye Thioflavin S (Fig. 1B) as well as ultrastructural
22 examination by electron microscopy (Fig. 1C). These assays confirmed the presence of misfolded
23 α -syn in both fractions. We also performed biochemical characterization of the stability of
24 assemblies after proteinase K digestion (Fig. 1D) and detergent treatments (Fig. 1E) followed by
25 α -syn dot-blot assays. While total α -syn content was comparable between selected fractions (as
26 measured by α -syn ELISA), LB fractions showed higher resistance to proteinase K treatment
27 (noLB $t_{1/2}$ =15.23minutes vs LB $t_{1/2}$ >60minutes) (Fig. 1D) as well as greater resistance to multiple
28 detergents, including 8M Urea (Fig. 1E). We then measured the content of α -syn aggregates using
29 human α -syn aggregation TR-FRET-based immunoassay, which revealed a significantly higher
30 amount of aggregated α -syn in LB fractions (Fig. 1F). To obtain insight into the content of
31 monomeric and aggregated α -syn within noLB and LB fractions of PD patients, sarkosyl
32 treatment was applied to both fractions to induce physical separation, and then velocity
33 sedimentation and density floatation gradients were performed to quantify these two respective
34 populations and determine their relative abundance in each fraction (Fig. S1 A-H). Strikingly,
35 while LB fractions contained ~90% of aggregated α -syn, noLB fractions were composed of ~10%
36 of this pathological form of the protein (Fig. S1 I). Also, in order to confirm the quality of the LB
37 extraction, we performed a filter retardation assay which showed that LB fractions, but not noLB
38 fractions, were highly enriched in known components of LBs, such as phosphorylated S129 α -
39 syn, ubiquitin, p62, hyperphosphorylated tau and A β (Fig. S2 A).

40 Micro-Infrared Spectroscopy of LB and noLB fractions was performed to show conformational
41 changes in amyloid structures at the molecular level (Fig. S2 B-E) and this confirmed the
42 presence of β -sheet structures in both assemblies (Fig. S2 B-C). Although their velocity of
43 sedimentation and density floatation characteristics were similar, the aggregates present in the LB
44 and noLB fractions were different in nature based upon the evidence of Micro-Infrared
45 Spectroscopy. Principal component analysis (PCA) showed that, in the LB fractions, large
46 aggregates corresponding to the major pieces of LB were present (Fig. S2D, cluster on the right).
47 PCA further showed that, in the range of 1,590-1,700 cm^{-1} , the LB group contained a fraction of

48 amyloid aggregates with different amyloid structures from those in the noLB group as they
49 clearly segregated by PCA in two clusters (Fig. S2 D-E). Altogether, these results suggest that
50 while LB fractions primarily contained large aggregated α -syn fibrils, noLB fractions contained
51 soluble α -syn and a smaller enrichment of α -syn aggregates featuring a specific amyloid structure
52 not found in the LB fractions.

53 Data from several studies suggest that both recombinant α -syn preformed fibrils (12-14) and
54 patient-derived α -syn (11) can promote pathogenic templating of endogenous α -syn ultimately
55 leading to dopaminergic neurodegeneration in SNpc. Following quantification by ELISA, both
56 mixes of fraction were diluted to \sim 24 pg α -syn per microliter. Then, those fractions were tested
57 for their pathogenic effects on TH-positive dopaminergic neurons in primary mesencephalic
58 cultures (Fig. S3 A) as well as *in vivo* in wild-type mice. Four months after supranigral injection,
59 LB-injected mice displayed, as expected, significant dopaminergic degeneration, while noLB
60 injections in mice had no impact on dopaminergic neurons (Fig. 1G-H) as we have previously
61 reported for other SNpc-derived LB fractions (11), thus validating the toxicity of the preparation
62 prior to injection into non-human primates.

63

64 *Intrastriatal injection of LB and noLB fractions from Parkinson's disease patients induces*
65 *nigrostriatal neurodegeneration in baboon monkeys*

66 To determine the mechanisms of α -syn aggregates toxicity in a species closer to humans, adult
67 baboon monkeys (n=4-7 per experimental group) received bilateral stereotaxic injections (100 μ l)
68 of either LB or noLB fractions into the putamen before euthanasia 24 months post-injection. This
69 time-frame was chosen based on our previous studies indicating that after 14 months post-
70 injection, ongoing pathogenic effects can already be measured, and was extended to potentially
71 reach disease-relevant lesions. Two years after administration, LB-injected monkeys displayed
72 significant striatal dopaminergic terminal loss both in the putamen and in the caudate nucleus,
73 accompanied by a significant decrease in tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity in the
74 substantia nigra pars compacta (SNpc) (Fig. 2). Stereological counts showed that LB-injected
75 animals exhibited TH-positive and Nissl-positive cell loss in the SNpc (16% and 23%,
76 respectively). No overt parkinsonism was observed, however, since the extent of the lesion
77 remained below the threshold for symptom appearance; i.e. 45% of cell loss (15), compared to an
78 age-matched control group.

79 At odds with mice either generated for the purpose of this study (Fig. 1G-H), previously
80 published (11), or produced in the context of other in-house studies (data not shown), noLB-

81 injected monkeys showed degeneration of the nigrostriatal pathway including dopaminergic cell
82 loss (i.e. 16% of TH-positive neurons and 28% of Nissl-positive neurons quantified by
83 stereology), similar to that observed in LB-injected monkeys (Fig. 2). Facing such an unexpected
84 finding, we aimed to identify specific characteristics of the pathological mechanisms involved in
85 α -syn toxicity induced by each fraction independently, using a large-scale approach in
86 combination with machine learning for pattern identification.

87

88 *Machine-learning algorithm predicts nigrostriatal degeneration*

89 We performed an exploratory approach and aimed to distinguish relevant variables allowing
90 accurate prediction of neurodegeneration (i.e., to operate a feature selection). Overall, we
91 investigated a large number of variables tapping on behavioral, histological, biochemical,
92 transcriptional and biophysical approaches (Fig. 3A) applied to several brain areas (n=40 – Fig.
93 3B), totalizing 180 variables measured for each individual (Fig. S4A for variable abbreviation
94 nomenclature; Table S1 for exhaustive list of variables; Table S2 features all raw data). We first
95 extracted from this dataset, every variable that actually quantified neurodegeneration (i.e.
96 dopaminergic markers such as TH or dopamine transporter by immunohistochemistry), ending up
97 with 163 variables per animal.

98 Then, to operate feature selection, we designed a distributed algorithm using multiple layer
99 perceptron (MLP) (Bourdenx and Nioche, 2018), a classic machine-learning algorithm based on
:00 artificial neural network that is able to approximate virtually any functions (Hornik et al., 1989).
:01 This algorithm was given, as input, the data obtained for each animal for the 163 aforementioned
:02 variables and its output is a rank of these variables regarding their ability to predict three
:03 indicators of dopaminergic tract integrity; that were levels of tyrosine hydroxylase staining in (i)
:04 the SNpc, (ii) the putamen and (iii) the caudate nucleus.

:05 The main difficulty was to overcome the large number of input variables (163) compared to the
:06 sample size (n=4-7 per group), which can induce a selection and reporting bias (Kuncheva and
:07 Rodriguez, 2018). In order to tackle this “ $p > n$ ” problem, instead of using a single network that
:08 could be prone to overfitting, we put in competition several networks.

:09 Each MLP was composed of a single hidden layer of 3 neurons (Fig. 3C). It has as input a subset
:10 of 3 variables (out of the 163) and as output the 3 indicators of dopaminergic tract integrity. In
:11 total, we used 708,561 sets of 3 inputs variables. Every instance of MLP was trained with 80% of
:12 our sample (always a combination of control and injected animals) and tested on the remaining
:13 20%. The performance of each set of 3 input variables was evaluated according to the difference
:14 between the predicted values of TH staining and the actual ones.

.15 We focused on the top 1% of the best networks and counted the occurrence of each of the 163
.16 variables in the subset of 3 variables used by these best networks (Fig. 3C). We ranked each
.17 variable according to the number of occurrences (Fig. 3C) for LB- (Fig. 3D) and noLB-injected
.18 animals (Fig. 3E) independently.

.19 In order to avoid possible overfitting, we used several methods in combination. First, we
.20 performed cross-validation by splitting the dataset into two parts: a training and a testing set of
.21 data. 80% of the data were randomly selected to train the networks (and independently for each
.22 network), while the 20% remaining were used to evaluate the networks. Then, in order to evaluate
.23 the robustness of the quality of prediction for a given set, we repeated this cross-validation step 50
.24 times for every set of 3 input variables (each network was trained and tested using a different
.25 partition of the dataset - total number of network: 35,428,050). Lastly, we generated random data
.26 and used them as input for the MLP. As expected, performances were significantly lower
.27 compared to our actual dataset (Fig. S4B, C).

.28 Overall, this unique approach allowed us to rank input variables according to their explanatory
.29 power and therefore to extract the strongest predictors of neurodegeneration for each
.30 experimental group. Interestingly, despite similar levels of nigrostriatal degeneration between LB-
.31 and noLB-injected animals (Fig. 2B), the algorithm allowed us to identify differential variable
.32 sorting patterns (Fig. 3D-E).

.33

.34 *MLP-derived signatures can identify unique characteristics between experiment group*

.35 Next, we compared the LB and noLB characteristics using the rank-rank hypergeometric overlap
.36 (RRHO) test (Fig. 4A). Interestingly, low similarity was observed for the highly ranked variables
.37 suggesting specific differences in the biological response to the injection of LB or noLB (Fig.
.38 4B). Focusing on the 20 first variables that showed low similarity between groups, we found that
.39 LB-exposed monkeys were characterized by both quantitative and qualitative changes in α -syn
.40 levels (i.e. phosphorylation at Ser129 and aggregation) especially in cortical areas corroborated
.41 by distinct methodologies as well as by a dysfunctional equilibrium in neurochemistry of basal
.42 ganglia output structures classically associated with parkinsonism (16, 17) (Fig. 4C – Fig. S5).
.43 Conversely, noLB-exposed monkeys exhibited more diverse nigrostriatal-centric characteristics
.44 with variables related to α -syn aggregation, proteostasis and Zn homeostasis (Fig. 4D - Fig. S6).
.45 Together, we identified specific properties for both groups with limited overlap (35% - 7/20
.46 variables) for an identical level of degeneration.

.47

.48 *Retrospective literature search validates MLP derived signatures*

:49 We next used a retrospective analysis to validate the relevance of the MLP-derived signature in
:50 PD. Although, some variables have never been investigated in the context of PD, others have
:51 been studied and reports exist in the literature. For instance, the amount of phosphorylated
:52 Ser129 α -synuclein in the entorhinal (*h.psyn.ctx.er.ant*) and parahippocampal (*h.psyn.ctx.phipp*)
:53 cortex - 1st and 2nd best predictors for the LB group – have been already associated with PD
:54 pathology. Studies of post-mortem brains from PD patients revealed the presence of LB in these
:55 regions which was correlated with disease progression (18) and predicted cognitive deficit in PD
:56 patients (19). Interestingly, the anterior entorhinal cortex has also been shown to be affected by
:57 severe α -syn pathology, related to olfactory dysfunction in prodromal phases of PD pathology
:58 (20). In addition, increased levels of phosphorylated Ser129 α -syn in sensorimotor
:59 (*h.syn.ctx.sma.ant*) and cingulate cortices (*h.syn.ctx.cg.ant*), shared by both LB and noLB
:60 signatures, have already been reported by our group in an independent cohort of non-human
:61 primates (11).

:62 Both LB and noLB signatures, and especially noLB, showed that variables related to α -syn
:63 aggregation status were among the best predictors (LB: 1 in top10 best predictors; noLB 3 in
:64 top10 best predictors). This was highly expected from the literature as α -syn aggregation has
:65 been associated with PD pathology (21).

:66 Variables related to the proteostasis network (levels of the lysosomal receptor LAMP2 –
:67 *wb.lamp2.sn* - 6th or amount of ubiquitinated proteins – *wb.ub.sn* – 9th) were more specifically
:68 associated with the noLB signature. This is of high interest as proteostasis defect is more and
:69 more considered as a key step in pathogenicity (22-24).

:70 Levels of the microglia marker, Iba1, was ranked as the third best predictor of neurodegeneration
:71 in the LB signature. Microglial inflammatory response was shown to be implicated in
:72 neurodegeneration in many animal models, including α -syn overexpressing and toxin-based
:73 animal model of PD (25).

:74 Lastly, *postmortem* analysis of Zn^{2+} concentration in the brains of PD patients has shown elevated
:75 levels in the striatum and SNpc (26). Conversely, a recent meta-analysis showed a decrease of
:76 circulating Zn^{2+} levels in PD patients (27). In experimental models of PD, Zn^{2+} accumulation has
:77 been associated with dopaminergic degeneration in rodent exposed to mitochondrial toxins (28,
:78 29).

:79 :80 *Experimental confirmation of MLPs' prediction*

:81 We aimed to confirm the relevance of the top first MLP selected variables. Since the LB signature
:82 was associated with changes in α -syn phosphorylation in cortical areas, we analyzed side-by-side

.83 the levels of α -syn and phosphorylated Ser129 α -syn in 18 brain regions (Fig. 5A). Interestingly,
.84 in agreement with the LB signature obtained from the MLP, LB-injected monkeys displayed a
.85 stronger accumulation of phosphorylated Ser129 α -syn compared to noLB-injected animals (Fig.
.86 5A-B). Also, the 2 most enriched variables of the LB signature (i.e. phosphorylated α -syn levels
.87 in parahippocampal and entorhinal cortices (Fig. 4C)) showed significant negative correlations
.88 with degrees of degeneration (Fig. 5C-D), thus confirming their ability to predict
.89 neurodegeneration.

.90 Then, we decided to confirm the relevance of one of the strongest predictors, the levels of Zn^{2+} in
.91 the SNpc in independent experiments. First, we observed a significant increase of Zn^{2+} in noLB-
.92 injected mice compared to sham-injected or LB-injected mice (Fig. S7A). Second, we analyzed
.93 the levels of Zn^{2+} in LB-injected macaque monkeys from a previous study of our laboratory (11).
.94 Interestingly, despite the fact that these experiments were done in a different non-human primate
.95 sub specie, injection of LB in the putamen (similar to the present study) or above the SNpc
.96 (different from the present study) induced elevation of Zn^{2+} levels in the SNpc, as measured by
.97 SR-XRF (Fig. S7B). Of note, the dimension of the effect was similar across studies (Fig. S7E).
.98 Then, to understand whether that modulation Zn^{2+} levels was specific to our experimental
.99 paradigm, we measured Zn^{2+} levels in the context of adeno-associated virus-mediated
.00 overexpression of mutant human α -syn in both rats and marmoset monkeys (30) using the same
.01 methodology (Fig. S7C, D). Here, overexpression of α -syn did not triggered accumulation of Zn^{2+}
.02 in the SNpc (despite inducing dopaminergic neurodegeneration – (30) suggesting that this
.03 phenomenon is specific to seeding experiment paradigms.

.04 Lastly, we analyzed a publicly available cortical proteomic database of healthy individual and PD
.05 patients. Of interest, we observed that several Zn^{2+} transporters were elevated in the brains of PD
.06 patients thus suggesting a zinc dyshomeostasis in patients (Fig. S7F). Indeed, plasma membrane
.07 transporters such as the zinc transporter 1 (ZnT1), the Zrt-/Irt-like protein 6 (ZIP6) and ZIP10
.08 showed increased levels (Fig. S7G-I) while the synaptic vesicle membrane transporter ZnT3
.09 remained constant (Fig. S7J).

.10

.11 *Association metric shows independence of strong predictors*

.12 As we used combinations of 3 variables and because of the structure of MLPs, one could expect
.13 that some combinations would complement each other to allow finer prediction of
.14 neurodegeneration levels. To address this question, we used a classic measurement of association
.15 in the field of data-mining: lift (31) and plotted the results as network plots showing association

16 (edge size) and enrichment in the best learners (node size). Lift calculation was corrected for error
17 prediction to avoid detrimental association between variables. The first observation was that the
18 most enriched variables (top 3 to 5) appeared to be self-sufficient to predict the neurodegeneration
19 levels with minimal error (Fig. 6). Some variables, with modest enrichment, showed strong
20 positive associations that were specific to each experimental group. Associated variables in LB-
21 injected monkeys were: (i) α -syn-related parameters along the SNpc-striatum-cortex axis, an
22 impairment of locomotion and the ethologically-defined orientation of the animals towards their
23 environment (Fig. 6 top left inset); (ii) oligomeric α -syn species measured in the midbrain and
24 striatum equally associated, but to lesser extent, with α -syn levels in cortex and plasma (Fig. 6 top
25 right inset).

26 In noLB-injected animals, the analysis shed light upon the relative abundance of two members of
27 the macroautophagy pathway (Fig. 6B top left) as well as the balance between monomeric and
28 high-molecular weight species of α -syn in the putamen (Fig. 6B bottom right). Such disruption of
29 the nigrostriatal pathway has repercussions upon the basal ganglia physiology as GABA levels in
30 their output structure, the internal globus pallidus, was associated with a decreased social
31 behavior (Fig. 6B bottom left inset).

32

33 **DISCUSSION**

34 In the present study, we report that, in non-human primates, injection of distinct α -syn assemblies
35 derived from PD patients lead to dopaminergic degeneration through discrete mechanisms.
36 Applying a machine-learning method, we gained insight into unique signatures of degeneration
37 induced by injection of two distinct α -syn pathogenic assemblies (i.e. those contained in the LB
38 and noLB fractions derived from idiopathic PD patients' brains). To do so, we built a large
39 dataset with 180 variables obtained from behavioral, histological, biochemical, transcriptional and
40 biophysical approaches applied to several brain areas for each individual. By using a distributed
41 MLP algorithm that we developed for the purpose of this study, we identified characteristics that
42 give insight into the strongest predictors of neurodegeneration for each experimental group. We
43 have, therefore, described for the first time that distinct α -syn assemblies leading to similar
44 degeneration in monkeys are associated with different mechanisms, hence experimentally
45 confirming the true multifactorial nature of synucleinopathies.

46 Our results illustrate that both small oligomeric as well as larger α -syn assemblies induce
47 dopaminergic degeneration in non-human primates. This finding was unexpected, since previous

48 mouse studies from our laboratory showed that noLB injection did not have any observable
49 consequence regarding dopaminergic degeneration, α -syn accumulation or phosphorylation (11).
50 In agreement, other groups also showed the absence of toxicity of soluble recombinant α -syn
51 (12). One possible explanation is that primate dopaminergic neurons could be highly susceptible
52 to α -syn toxicity. This could be in part due to their unique cellular architecture (32), a feature
53 already known to contribute to the selective vulnerability of these neurons in PD (33). In fact, the
54 large and complex axonal arbor of dopamine neurons make them particularly vulnerable to factors
55 that contribute to cell death and , in primates, this axonal arbor is ten-fold the size of that in
56 rodents (32). In addition, primate dopamine neurons display unique molecular characteristics (e.g.
57 the presence of neuromelanin, the intracellular levels of which have been shown to be important
58 in the threshold for the initiation of PD) (34). These unique features of primate dopaminergic
59 neurons might be important in explaining the toxic mechanisms of the relatively low content of α -
60 syn aggregates in the noLB fractions. Additional studies are now needed to fully address the
61 question of host-seed interactions, but our results highlight the relevance and the need of the non-
62 human primate model for the study of synucleinopathies.

63 We also confirmed that the toxicity mechanisms associated with patient-derived α -syn aggregates
64 are shared features among patients and, therefore, common to the disease. Indeed, LB and noLB
65 fractions used in this study were isolated from a pool of 5 patients who were different from the
66 pool of 3 patients used in our previous study in mice (11). In the mice experiment (Fig. S3B)
67 performed in this study, we observed the same level of dopaminergic degeneration (~40% at 4
68 months after injection).

69 The surprising observation, in non-human primates, that the noLB fraction is toxic to the same
70 extent as the LB fraction suggests the existence of previously unrecognized forms of α -syn
71 toxicity. Several studies have suggested that pre-fibrillar oligomeric species are the toxic α -syn
72 species (8, 9). Our biochemical studies showed that noLB and LB fractions had different amyloid
73 properties (Fig. 1), contents (Fig. S1, S2A) and structures (Fig. S2B-E). Indeed, LB fractions
74 contained a majority of large aggregated α -syn fibrils as well as some smaller aggregates while
75 noLB fractions contained a smaller proportion (10 folds) of smaller aggregates and soluble α -syn.
76 More importantly, the smaller aggregates were different in nature between LB and noLB
77 fractions, as shown by micro-infrared spectroscopy (Fig. S2B-E). One could hypothesize that the
78 observed effect is due to a species common between LB and noLB. However, because of the
79 extent of degeneration, which was similar between the two experimental groups, and the α -syn
80 content dissimilarity, both in amount and nature, this appears very unlikely. We believe that our

.81 results support the notion of the existence of a range of α -syn pathogenic structures with distinct
.82 toxic properties within the PD brain. Further work is necessary to provide a complete structural
.83 characterization of those species. As yet, very few studies report the high-resolution structures of
.84 α -syn aggregates, which are on the one hand, only derived from studies using recombinant α -syn
.85 and, on the other hand, limited to near atomic resolution (35-37). Encouragingly, much effort is
.86 currently being devoted to this field of research and two recent studies reported the atomic
.87 structure of α -syn fibrils determined by cryo-electron microscopy (38, 39), while still being
.88 limited to recombinant-generated α -syn, and not isolated from human brain tissue.

.89 In order to perform a characterization of the effects of the two fractions, we developed a machine
.90 learning method to identify their biological characteristics. It is now well accepted that machine
.91 learning algorithms can be trained to detect patterns as well as, or even better than, humans (40-
.92 42). Instead of the classification algorithms (the algorithm learns to identify in which category a
.93 sample belongs) that were mostly used in recent applications of machine learning in biology (43),
.94 we chose in this study to predict continuous and biologically-relevant variables using MLPs. Our
.95 choice was motivated by the limited sample size that is often a constraint of experimental biology.
.96 Although it might have been possible to use other feature selection methods, the use of MLPs
.97 with a distributed architecture allowed us to avoid overfitting issues and to develop a method
.98 particularly well-suited for low sample size datasets (44). As both LB and noLB-injected
.99 monkeys displayed similar levels of degeneration, they were indistinguishable using that
.00 endpoint. Instead of using a clustering analysis or a classification method, hence making the *a*
.01 *priori* assumption that these groups were different, we preferred to submit the two experimental
.02 groups to the MLP independently.

.03 The combination of this constrained, distributed architecture and the holistic approach allowed us
.04 to rank input variables according to the number of times they appeared in the group of best
.05 predictors (defined as top 1% of best networks). A major issue in the use of machine learning in
.06 experimental biology in the ‘black-box’ is the fact that it is usually impossible to ‘understand’
.07 how an algorithm predicted an output (45). By using a reverse engineering method, we aimed to
.08 tackle that issue. Because we explored all possible combinations of our variables, we could rank
.09 the input variables assuming that the more they appeared in the top 1%, the more they contained
.10 information allowing precise prediction of the neurodegeneration levels. Interestingly, our two
.11 experimental groups showed that some of the best predictors were similar (about 30%) but the
.12 majority were different. One could hypothesize that the similar variables between the two
.13 signatures probably embedded information that are consequences of neurodegeneration while the

.14 different ones probably contain information regarding the process of disease initiation and/or
.15 progression. Further experimental studies are now needed to confirm the relevance of these
.16 variables.

.17 Also, as these two kinds of α -syn assemblies were associated with different signatures identified
.18 by our MLP approach, we propose that our results illustrate the multifactorial nature of the
.19 disease as different mechanisms (i.e. signatures) initiated by different triggers (i.e. α -syn
.20 assemblies) led to similar consequences (i.e. degeneration levels).

.21 Using this methodology, we confirmed the interest of highly-expected variables but more
.22 importantly also unexpected variables that appear to be excellent predictors of α -syn-associated
.23 dopaminergic degeneration. The first hit for LB-injected animals was phosphorylated α -syn in the
.24 entorhinal cortex (as we have previously shown) followed by phosphorylated α -syn in the para-
.25 hippocampal cortex (unexpected), striatal microglial activation and GABA dysregulation in the
.26 internal part of the globus pallidus (expected) (Fig. S5). Conversely, Zn homeostasis was a strong
.27 predictive variable (unexpected) followed by α -syn aggregation-related terms (expected) in
.28 noLB-injected animals (Fig. S6).

.29 In order to confirm the prediction made by the MLP approach, we first performed a retrospective
.30 literature analysis. This analysis showed that a significant part of the best predictors has been
.31 shown in the literature to be correlated with disease progression. Then, we attempted to confirm
.32 the interest of one of the top hits, the accumulation of Zn^{2+} in the SNpc, in independent
.33 experimental cohorts. Interestingly, we here describe that both in mice injected with noLB or in
.34 macaque monkeys (a different non-human primate sub species than the baboons used in that
.35 study) injected either in the striatum or in the SNpc, Zn levels were increased in the SNpc.
.36 However, in mice, Zn dyshomeostasis was not associated with neurodegeneration in the noLB
.37 group (at odds with what was observed in monkeys) suggesting another species difference in the
.38 relationship between zinc levels and dopaminergic tract integrity. Surprisingly, that result was not
.39 observed in rats and marmoset monkeys overexpressing human mutant α -syn. This observation
.40 might suggest that Zn dyshomeostasis is a feature of disease not triggered in the context of human
.41 mutant α -syn overexpression that is associated with fast progressing pathology (Bourdenx et al.
.42 2015). Then, in order to expand our results to human pathology, we analyzed a publicly available
.43 proteomic dataset of human samples. According to that analysis, PD patients displayed increased
.44 levels of plasma membrane Zn transporters, hence suggesting a Zn dyshomeostasis in patients. In
.45 the context of PD, Zn dyshomeostasis has been associated with autophagy/lysosomal dysfunction

.46 in the context of *PARK9* mutations (Ramirez et al. 2006, Dehay et al. 2012). Further studies are
.47 now needed to fully unravel this connection.

.48 Altogether, our findings show that primate dopaminergic neurons are sensitive to both small,
.49 mostly soluble, α -syn extracts as well as larger, aggregated, α -syn extracts derived from PD
.50 patients. These findings involve two immediate outcomes. First, since this toxicity has not been
.51 reported so far it suggest species differences that would need to be thoroughly investigated (46,
.52 47) and calls for a systematic appraisal of proteinopathies in primates in particular for validating
.53 therapeutic strategies before clinical testing (48). Second, the present study highlights the
.54 complex structure-toxicity relationship of α -syn assemblies and corroborates the multifactorial
.55 origin of synucleinopathies as distinct assemblies can induce similar degeneration (that would
.56 probably lead to similar clinical manifestation in patients) through different mechanisms,
.57 nigrostriatal or extranigral brain pathways, calling for molecular diagnosis to identify patient sub-
.58 populations before launching large-scale, heterogeneous in nature, clinical trials. Finally, we
.59 developed a machine-learning approach allowing and quantitative assessment of the explanatory
.60 power of a given set of variables compatible with the constrained sample size of experimental
.61 biology.

.62

.63

.64
.65
.66
.67
.68
.69
.70
.71
.72
.73
.74
.75
.76
.77
.78
.79
.80
.81
.82
.83
.84
.85
.86
.87
.88
.89
.90
.91
.92
.93
.94
.95
.96
.97

MATERIALS AND METHODS

Access to data and machine-learning code for replicability and further use by the community

The entire raw data set is made available to the readers (Table S2). Authors chose not to provide representative examples of each procedure for the sake of space and because the entire data set is fully disclosed. Further information and requests for examples should be directed to and will be fulfilled by the Corresponding Contacts. Hyperlink to the machine-learning code (10.5281/zenodo.1240558) is provided (<https://zenodo.org/record/1240558#.XC8pqy17Su4>).

Ethics statement

Experiments were performed in accordance with the European Union directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) on the protection of animals used for scientific purposes. The Animal Experimentation Ethical Committee (CEEA) of the Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR) approved experiments under the license number CEEA 81/13 (rats). The Institutional Animal Care and Ethical Committee of Bordeaux University (CE50, France) approved experiments under the license number 5012099-A (mice). The Institutional Animal Care and Ethical Committee of Murcia University (Spain) approved experiments under the license number REGA ES300305440012 (monkeys).

Animals and Stereotactic Injections

Mice. Wild-type C57BL/6 mice (4 months old) received 2 μ l of either LB fractions or noLB fractions by stereotactic delivery to the region immediately above the right substantia nigra (coordinates from Bregma: AP=-2.9, L= -1,3, DV=-4.5) at a flow rate of 0.4 μ l/min and the pipette was left in place for 5 min after injection to avoid leakage. Mice were killed four months after injection. Ten to fifteen mice were used in each group.

Monkeys. Animals, which were from the research animal facility of the University of Murcia (Murcia, Spain) and housed in 2 multi-male multi-female exterior pens, were studied in a breeding farm over 2 years (Murcia, Spain). Animals were fed fruits, vegetables and monkey pellets twice a day before 9 am and after 5pm. Water was available ad libitum. 17 healthy adult olive baboons (*Papio papio*) were used in this study. Group sizes were chosen assuming a one-tailed alpha of 0.05, with sample size of at least three per group, which provided >80% power to detect a difference between the treatment groups and the control group, using a Fisher's exact test. Animals were randomized into treatment or control groups. Six baboons were used for LB

injections, four were used for noLB injections and seven were untreated control animals. Intrastratial injections of either LB fractions or noLB fractions were performed at 2 rostrocaudal levels of the motor striatum (anterior commissure [AC], -1mm and -5mm) under stereotactic guidance as previously described (49-52) . The total injected volume per hemisphere was 100µl (2 injection sites with 50µl each at 3µl/min at each location site). After each injection, the syringe was left in place for 10 min to prevent leakage along the needle track. A number of parameters were monitored during the course of the two-year study, including survival and clinical observations. At the end of the experiment (24 months post-injection), all monkeys were euthanised with pentobarbital overdose (150mg/kg i.v.), followed by perfusion with room-temperature 0.9% saline solution (containing 1% heparin) in accordance with accepted European Veterinary Medical Association guidelines. Brains were removed quickly after death. Each brain was then dissected along the midline and each hemisphere was divided into three parts. The left hemisphere was immediately frozen by immersion in isopentane at -50°C for at least 5 min and stored at -80°C. The right hemisphere was fixed for one week in 10 vol/tissue of 4% paraformaldehyde at 4°C, cryoprotected in two successive gradients of 20 then 30% sucrose in phosphate buffered saline (PBS) before being frozen by immersion in isopentane (-50°C) for at least 5 min and stored at -80°C until sectioning. CSF and blood samples (plasma, serum, whole blood) in the 17 animals were carefully collected before euthanasia. No samples were excluded from analysis in these studies.

Purification of Lewy bodies from human PD Brains

The samples were obtained from brains collected in a Brain Donation Program of the Brain Bank “GIE NeuroCEB” run by a consortium of Patients Associations: ARSEP (association for research on multiple sclerosis), CSC (cerebellar ataxias), France Alzheimer and France Parkinson. The consents were signed by the patients themselves or their next of kin in their name, in accordance with the French Bioethical Laws. The Brain Bank GIE NeuroCEB (Bioresource Research Impact Factor number BB-0033-00011) has been declared at the Ministry of Higher Education and Research and has received approval to distribute samples (agreement AC-2013-1887). Human SNpc was dissected from fresh frozen postmortem midbrain samples from 5 patients with sporadic PD exhibiting conspicuous nigral LB pathology on neuropathological examination (mean age at death: 75 ± 2.75 years; frozen post-mortem interval: 31.8 ± 7.45 h; GIE Neuro-CEB BB-0033-00011). Tissue was homogenized in 9 vol (w/v) ice-cold MSE buffer (10 mM MOPS/KOH, pH 7.4, 1Msucrose, 1mM EGTA, and 1mMEDTA) with protease inhibitor cocktail (Complete Mini; Boehringer Mannheim) with 12 strokes of a motor-driven glass/teflon dounce

32 homogenizer. For LB purification, a sucrose step gradient was prepared by overlaying 2.2 M with
33 1.4 M and finally with 1.2 M sucrose in volume ratios of 3.5:8:8 (v/v). The homogenate was
34 layered on the gradient and centrifuged at 160,000 x g for 3 h using a SW32.1 rotor (Beckman).
35 Twenty-six fractions of 1500 µl were collected from each gradient from top (fraction 1) to bottom
36 (fraction 26) and analyzed for the presence of α -synuclein aggregates by filter retardation assay,
37 as previously described (11). Further characterization of LB fractions was performed by
38 immunofluorescence, α -synuclein ELISA quantification and electron microscopy as previously
39 described (11). For stereotactic injections, LB-containing fractions from PD patients were mixed
40 together in the same proportion (PD#1, fractions 19 and 20; PD#2, fractions 19 and 20; PD#3,
41 fraction 22; PD#4, fractions 17,18 and 19; PD#5, fractions 20, 21 and 23). NoLB-containing
42 fractions (i.e. fraction 3, at the beginning of the 1,2M interface) derived from the same PD
43 patients (which contain soluble or finely granular α -synuclein) but lacks large LB-linked α -
44 synuclein aggregates were obtained from the same sucrose gradient purification. Using enzyme-
45 linked immunosorbent assay (ELISA) kit against human α -synuclein (Invitrogen, #KHB0061 –
46 following manufacturer’s recommendations), α -syn concentration was measured and both LB and
47 noLB fractions were adjusted to ~24 pg α -synuclein per microliter. In all cases, samples were
48 bath-sonicated for 5 min prior to *in vitro* and *in vivo* injections.

50 **Characterization of noLB and LB fractions**

51 *Electron microscopy.* Briefly, carbon-coated nickel grids were covered for 1 min with
52 corresponding fractions of interest, then washed 3 times with distilled water. They were then
53 washed again in distilled water and stained for 5 min with 2% uranyl acetate, before being air-
54 dried. Digital images were obtained with a computer linked directly to a CCD camera (Gatan) on
55 a Hitachi H-7650 electron microscope. In all cases, samples were bath-sonicated for 5 min prior
56 to the *in vitro* applications.

57 *Immunofluorescence analysis of noLB and LB fractions.* Indicated fractions from the sucrose
58 gradient were spread over slides coated with poly-D lysine and fixed with 4% paraformaldehyde
59 (PFA) in PBS for 30 min. Fixed slides were stained with 0.05% thioflavin S for 8 min and then
60 washed three times with 80% EtOH for 5 min, followed by two washes in PBS for 5 min. Finally,
61 all samples were washed 3 times with PBS and blocked with 2% casein and 2% normal goat
62 serum for 30 min. For immunofluorescence analyses, samples were incubated with human α -
63 synuclein specific antibody (clone syn211, Thermo Scientific, 1:1000) for 30 min, washed three
64 times with PBS, incubated with a goat anti-mouse TRITC (Jackson, 1:500), before being cover-
65 slipped for microscopic visualization using fluorescence mounting medium.

66 *Dot-blotting analysis.* To evaluate PK-resistant α -synuclein contained in noLB and LB fractions
67 derived from PD brains, each fraction was subjected to digestion with 1 μ g/ml proteinase K for 0,
68 15, 30, 45, and 60 min. The reaction was stopped by boiling for 5 min before dot-blotting with
69 syn211 antibody. To analyze their stability, noLB and LB fractions were treated with increasing
70 concentrations of urea (7 and 8M) or sodium dodecyl sulfate (SDS) (0.5, 1 and 2%) for 6 h at
71 room temperature. α -Synuclein was visualized as described above.

72 Filter retardation assay of noLB and LB fractions were probed with antibodies against,
73 phosphorylated α -synuclein (Abcam EP1536Y, 1:1000), ubiquitin (Sigma-Aldrich U5379,
74 1:1000), p62 (Progen GR62-C, 1:1000), hyperphosphorylated tau (AT8, MN1020,
75 ThermoFischer) or A β (DAKO clone 6F/3D, 1:1000).

76 *Human α -Synuclein aggregation TR-FRET immunoassay.* Time-resolved Förster's resonance
77 energy transfer (TR-FRET)-based immunoassays were validated for total and oligomeric α -
78 synuclein (53). Ten microliters of noLB and LB samples were analyzed for total α -synuclein
79 quantification with the TR-FRET immunoassays kit against human α -synuclein aggregation kit
80 (Cisbio, #6FASYPEG) according to the manufacturer's instructions.

81 *Velocity sedimentation and density floatation α -synuclein profiles in noLB and LB fractions.*
82 Frozen noLB and LB fractions aliquots (100 μ L) were thawed and solubilized in solubilization
83 buffer (SB) to reach 10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, Complete
84 EDTA-free protease inhibitors (Roche), PhosSTOP phosphatase inhibitors (Roche), 1 U/ μ L
85 Benzonase (Novagen), 2 mM MgCl₂ and 2% (w/v) N-lauroyl-sarcosine (sarkosyl, Sigma) final
86 concentrations, by incubating at 37°C under constant shaking at 600 rpm (Thermomixer,
87 Eppendorf) for 45 minutes.

88 For velocity sedimentations, a volume of 400 μ L of solubilized noLB / LB fraction was loaded on
89 top of a 11 mL continuous 5-20% iodixanol gradient (Optiprep, Sigma) in SB buffer containing
90 0.5% w/v final sarkosyl concentration, linearized directly in ultracentrifuge 11 mL tubes (Seton)
91 with a Gradient Master (Biocomp). For density floatation gradients, a volume of 400 μ L of
92 solubilized noLB / LB fraction was mixed to reach 40% iodixanol in SB buffer with 0.5% w/v
93 final sarkosyl concentration and loaded within an 11 mL 10-60% discontinuous iodixanol
94 gradient in SB buffer with 0.5% w/v final sarkosyl concentration. The gradients were centrifuged
95 at 180,000 g for 3 hours (velocity) or for 17 hours (density) in a swinging-bucket SW-40 Ti rotor
96 using an Optima L-90K ultracentrifuge (Beckman Coulter). Gradients were then segregated into
97 16 equal fractions from the top using a piston fractionator (Biocomp) and a fraction collector
98 (Gilson). Fractions were aliquoted for further analysis of their content by dot-blot. Gradient
99 linearity was verified by refractometry.

.00 For dot blotting, aliquots of the collected native fractions were spotted onto Hybond PVDF 0.2
.01 μm membranes (GE Healthcare) using a dot blot vacuum device (Whatman). For total (MJFR1)
.02 and phosphorylated pS129 (EP1536Y) α -synuclein immunolabelling, a step of fixation in PBS -
.03 0.1% glutaraldehyde was performed at this point, followed by 3 washes in PBS. Membranes were
.04 then blocked with 5 % (w/v) skimmed milk powder in PBS - 0.1% (v/v) Tween and probed with
.05 anti-human α -synuclein (MJFR1, rabbit 1:10000, Abcam), anti-phospho pS129 α -synuclein
.06 (EP1536Y, rabbit 1:5000, Abcam) or anti α -synuclein aggregate specific FILA-1 (MJFR14-6-4-2,
.07 rabbit 1:10000, Abcam) primary antibodies in PBS-T - 4% (w/v) BSA, and secondary goat anti
.08 rabbit IgG HRP-conjugated antibodies (1:10000, Jackson Laboratories) in PBS-T 1% (w/v) milk.
.09 Immunoreactivity was visualized by chemiluminescence (GE Healthcare). The amount of the
.10 respective protein in each fraction was determined by the Image Studio Lite software, after
.11 acquisition of chemiluminescent signals with a Chemidoc imager (Biorad). Profiles obtained by
.12 immunoblot were normalized and plotted with SEM using the Prism software.

.13 *FTIR microspectroscopy.* 1-2 μL of each suspension was deposited on a CaF_2 window and dried
.14 at room pressure and temperature. The protein aggregates were then measured in transmission at
.15 $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ spatial resolution with an infrared microscope (54). Depending on its size it was
.16 possible to collect one to twenty spectra inside each aggregate. The infrared microscope was a
.17 Thermo Scientific Continuum equipped with a MCT detector and a 32x 0.65 NA Replachromat
.18 objective and matching condenser, coupled to a Thermo Scientific Nicolet 8700 spectrometer
.19 with a global source and KBr beamsplitter. The microscope was operated in dual path single
.20 aperture mode. Spectra were recorded between $650\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ at 2 cm^{-1} resolution, with Happ-
.21 Genzel apodization and Mertz phase correction. Spectra were processed in Omnic 9.2 for
.22 automatic atmospheric correction to remove water vapor contribution.

.24 **Rat Ventral Midbrain Primary Cultures**

.25 Postnatally derived ventral midbrain cultures were prepared essentially as previously described
.26 (55). Briefly, cultures were prepared in two steps. In the first step, rat astrocyte monolayers were
.27 generated as follows. The entire cerebral cortex from a single rat pup (postnatal days 1–2) was
.28 removed, diced, and then mechanically dissociated by gentle trituration. The isolated cells were
.29 plated at 80,000 cells per well under which a laminin-coated coverslip was affixed. The cells
.30 were housed at 37°C in an incubator in 5% CO_2 and were fed on glial media (89% MEM, 9.9%
.31 calf serum, 0.33% glucose, 0.5 mM glutamine, and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin). Once confluence had been
.32 attained (about 1 week in vitro), fluorodeoxyuridine (6.7 mg/mL) and uridine (16.5 mg/mL) were
.33 added to prevent additional proliferation. In the second stage, which occurred 1 week later, rat

pups aged between 1 and 2 days were anesthetized and 1-mm³ blocks containing ventral midbrain neurons were dissected from 1-mm-thick sagittal sections taken along the midline of the brain. Tissues were collected immediately into cold phosphate buffer and were treated enzymatically using papain (20 U/mL) with kynurenate (500 μM) at 37°C under continuous oxygenation with gentle agitation for 2 h. A dissociated cell suspension was achieved by gentle trituration and was then plated onto the preestablished glia wells at a density of 0.5–1.7 million neurons per well. Cultures were maintained in specially designed neuronal media (47% MEM, 40% DMEM, 10% Hams F-12 nutrient medium, 1% calf serum, 0.25% albumin, 2 mg/mL glucose, 0.4 mM glutamine, 10 μg/mL catalase, 50 μM kynurenic acid, 10 μM CNQX, 25 μg/mL insulin, 100 μg/mL transferrin, 5 μg/mL superoxide dismutase, 2.4 μg/mL putrescine, 5.2 ng/mL Na₂SeO₃, 0.02 μg/mL triiodothyronine, 62.5 ng/mL progesterone, and 40 ng/mL cortisol) containing 27 μM fluorodeoxyuridine and 68 μM uridine to control glial outgrowth and in 10 ng/mL glial cell derived neurotrophic factor (GDNF). They were incubated for a further 7–8 days until the start of experiments. All tyrosine hydroxylase (TH) neurons were counted on each plate following the addition of noLB and LB fractions after 1, 2, 5 and 7 days of treatment.

Non-Human Primate Behavioral Assessment

Following a 4-hour minimum habituation phase performed one day before the beginning of the observations, baboon behavior was observed outside the feeding and cleaning times, in a random order at two-time points (morning and afternoon), over 4 to 9 days (8 sessions per group). On the 1st observational time point (i.e. 1-month post-surgery), the habituation phase was performed over 3 days allowing the observer to recognize the animals individually. We used a scan-sampling method, appropriate for time budgeting (56), in which behavioral parameters were assessed every 5 minutes during 2-hour sessions, resulting in 192 scans per individual. Extra observational sessions were performed to avoid missing data. A unique trained observer (SC; intra-observer reliability: Spearman rank order correlation R=0.987) collected the data live on the 2-time points of the study: at 1- and 24-months post-surgery. The observer was standing 1 m away from the outdoor cages. We focused on behavioral profiles rather than single items and used two repertoires: one reports the interaction with the environment and one describes the position within the environment, according to published protocols (57-59). We investigated the percentages of occurrence of each item with regard to the total number of scans in order to obtain mean behavioral and postural time budgets, body orientation and location profiles.

Histopathological analysis

.68 *Extent of lesion.* To assess the integrity of the nigrostriatal pathway, tyrosine hydroxylase (TH)
.69 immunohistochemistry was performed on SNpc and striatal sections. Briefly, 50 μ m free-floating
.70 sections from one representative level of the striatum (anterior, medial and posterior) and serial
.71 sections (1/12) corresponding to the whole SNpc were incubated with a mouse monoclonal
.72 antibody raised against human TH (Millipore, MAB318, 1:5000) for one night at RT and revealed
.73 by an anti-mouse peroxidase EnVisionTM system (DAKO, K400311) followed by DAB
.74 visualization. Free-floating SNpc sections were mounted on gelatinized slides, counterstained
.75 with 0.1% cresyl violet solution, dehydrated and coverslipped, while striatal sections were
.76 mounted on gelatinized slides and coverslipped. The extent of the lesion in the striatum was
.77 quantified by optical density (OD). Sections were scanned in an Epson expression 10000XL high
.78 resolution scanner and images were used in ImageJ open source software to compare the grey
.79 level in each region of interest: i.e. caudate nucleus and putamen. TH-positive SNpc cells were
.80 counted by stereology blind with regard to the experimental condition using a Leica DM6000B
.81 motorized microscope coupled with the Mercator software (ExploraNova, France). The substantia
.82 nigra was delineated for each slide and probes for stereological counting were applied to the map
.83 obtained (size of probes was 100x80 μ m spaced by 600x400 μ m). Each TH-positive cell with its
.84 nucleus included in the probe was counted. The optical fractionator method was finally used to
.85 estimate the total number of TH-positive cells in the SNpc of each monkey hemisphere. In
.86 addition, we measured Nissl cell count, the volume of SN, and the surface of TH-occupied in SN
.87 to fully characterize the pattern of dopaminergic cell loss in the SN.

.88 *α -synuclein pathology.* Synucleinopathy was assessed with a mouse monoclonal antibody raised
.89 against human α -synuclein (syn211) and phosphorylated α -synuclein (clone11A5, Elan, 1:5000)
.90 immunostaining as we previously reported (11, 30). Briefly, selected sections at two rostro-caudal
.91 levels were incubated in a same well to allow direct comparison of immunostaining intensity.
.92 Sections were incubated overnight at room temperature with the aforementioned antibodies. The
.93 following day, revelation was performed with anti-specie peroxidase EnVision system (DAKO)
.94 followed by 3,3' -diaminobenzidine (DAB) incubation. Sections were then mounted on
.95 gelatinized slides, dehydrated, counterstained if necessary and coverslipped until further analysis.
.96 Grey level quantification or immunostaining-positive surface quantification in forty brain regions
.97 (Fig. 2B) were performed as previously described (30).

.98 *Inflammation.* Inflammatory process in the striatum, in the entorhinal cortex and in the white
.99 matter of noLB and LB-injected monkeys was measured through GFAP/S-100 (DAKO,
.00 Z0334/Abnova, PAP11341) and Iba1 (Abcam, ab5076) immunohistochemistry. Striatal sections
.01 of all animals were incubated together over night with a mix of rabbit antibodies raised against

GFAP and S-100 for the astroglial staining (respective dilutions 1:2000 and 1:1000) and with a goat anti-Iba1 antibody for the microglial staining (dilution 1:1000). These signals were revealed with anti-specie peroxidase EnVision system (DAKO) followed by DAB incubation. Sections were mounted on slides, counter-stained in 0.1% cresyl violet solution, dehydrated and cover-slipped. Sections stained by GFAP-S-100 were numerized at x20 magnification with a NanoZoomer (Hamamatsu, France) and the quantification of GFAP-positive astrocytic reaction was estimated by a immunostaining-positive surface quantification at regional levels with the Mercator software (ExploraNova, France). Sections stained by Iba1 were used for the microglial morphology analysis through fractal dimension quantification based on microscopic acquisitions, as previously described(60). All analyses were performed blinded to the researcher.

mRNA extraction and qRT-PCR

Substantia nigra samples were homogenized in Tri-reagent (Euromedex, France) and RNA was isolated using a standard chloroform/isopropanol protocol(61). RNA was processed and analyzed following an adaptation of published methods(62). cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Fermentas) and primed with oligo-dT primers (Fermentas) and random primers (Fermentas). QPCR was performed using a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Meylan, France). QPCR reactions were done in duplicate for each sample, using transcript-specific primers, cDNA (4 ng) and LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) in a final volume of 10 µl. The PCR data were exported and analyzed in an informatics tool (Gene Expression Analysis Software Environment) developed at the NeuroCentre Magendie. For the determination of the reference gene, the Genorm method was used(63). Relative expression analysis was corrected for PCR efficiency and normalized against two reference genes. The proteasome subunit, beta type, 6 (Psm6) and eukaryotic translation initiation factor 4a2 (EIF4A2) genes were used as reference genes. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method(63).

Primers sequences: Psm6 (NM_002798) forward: CAAGAAGGAGGGCAGGTGTACT; Psm6 (NM_002798) reverse: CCTCCAATGGCAAAGGACTG; EIF4a2 (NM_001967) forward: TGACATGGACCAGAAGGAGAGA; EIF4a2 (NM_001967) reverse: TGATCAGAACACGACTTGACCCT; SNCA (CR457058) forward: GGGCAAGAATGAA GAAGGAGC; SNCA (CR457058) reverse: GCCTCATTGTCAGGATCCACA.

Biochemical analysis

'35 *Total protein extraction and quantification.* Immunoblot analyses were performed on substantia
'36 nigra, putamen and caudate nucleus. Five tissue patches were extracted on ice using 100µl of
'37 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 0.5% Na-
'38 deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate) with a protease inhibitor cocktail tablet (Complete
'39 Mini, Roche Diagnostics). The lysate was placed on ice for 20 min and then centrifuged at
'40 14,000rpm for 15 min at 4°C. The supernatant was collected and the Bicinchoninic Acid (BCA)
'41 Assay was used to determine the total amount of protein in the lysates, and then stored at -80°C.
'42 Based on total protein concentrations calculated from the BCA assays, aliquots of tissue lysates
'43 corresponding to known amounts of total protein per lane were prepared for each animal in
'44 Laemmli buffer (Tris-HCl 25mM pH=6.8, Glycerol 7.5%, SDS 1%, DTT 250mM and
'45 Bromophenol Blue 0.05%) for immunoblotting experiment.

'46 *Biochemical fractionation.* This technique was performed as described(64). Tissue patches (n=10)
'47 were homogenized in 200µl of high-salt (HS) buffer (50 mmol/L of Tris, 750 mmol/L of NaCl, 5
'48 mmol/L of EDTA, and a cocktail of protease inhibitors and phosphatase inhibitors). Samples were
'49 sedimented at 100,000 × g for 20 minutes, and supernatants were removed for analysis. Pellets
'50 were rehomogenized in successive buffers, after which each was sedimented, and supernatant was
'51 removed: HS containing 1% Triton X-100 (HS/Triton) (Variable names terminated as ultra.s1),
'52 RIPA (50 mmol/L of Tris, 150 mmol/L of NaCl, 5 mmol/L of EDTA, 1% NP40, 0.5% Na
'53 deoxycholate, and 0.1% SDS) (Variable names terminated as ultra.s12, and SDS/urea (8 mol/L of
'54 urea, 2% SDS, 10 mmol/L of Tris; pH 7.5) (Variable names terminated as ultra.p2). Sodium
'55 dodecyl sulfate sample buffer was added, and samples were heated to 100°C for 5 minutes prior
'56 to immunoblot analysis.

'57 *Western blot analysis.* Western blots were run in all conditions from 20µg of protein separated by
'58 SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. Incubation of the primary antibodies was performed
'59 overnight at 4°C with rabbit anti-LC3 (1:1000, Novus Biologicals), rabbit anti- LAMP-2 (1:1000,
'60 Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-TH (1:1000, Millipore), goat p62 (1:1000, Progen),
'61 mouse anti human-α-synuclein (1:1000, Thermo Scientific). For detection of ubiquitinated
'62 proteins, proteins were transferred on polyvinylidene fluoride membranes (Millipore) and
'63 subjected to Western blot analysis using a rabbit anti-Ubiquitin (1:1000, Sigma U5379). Anti-
'64 actin (1:5000, Sigma) was used to control equal loading. Appropriate secondary antibodies
'65 coupled to peroxidase were revealed using a Super Signal West Pico Chemiluminescent kit
'66 (Immobilon Western, Chemiluminescent HRP substrate, Millipore). Chemiluminescence images
'67 were acquired using the ChemiDoc+XRS system measurement (BioRad). Signals per lane were

'68 quantified using ImageJ and a ratio of signal on loading per animal was performed and used in
'69 statistical analyses.

'70 *Dot-blot analysis of α -synuclein.* This technique was performed as we previously described(9,
'71 11). After heating at 100 °C for 5 min, 20 μ g of protein extract was diluted in buffer (25 mM Tris-
'72 HCl, 200 mM Glycine, 1% SDS) and filtered through either a nitrocellulose membrane or an
'73 acetate cellulose membrane (Bio-Rad, 0.2 μ m pore size). Membranes were then saturated in 5%
'74 dry-skimmed milk in PBS and probed with antibodies against α -synuclein (syn211, 1:1000), both
'75 α -synuclein fibrils and α -synuclein oligomers (Syn-O1, 1:10000(65, 66)) (kindly provided by
'76 Prof. Omar El-Agnaf). Revelation was done as described in the previous Materials and Methods
'77 section.

'78

'79 **Synchrotron radiation X-ray fluorescence (SR-XRF) microscopy elemental mapping of** '80 **brain tissue cryosections**

'81 The synchrotron experiments were carried out at Diamond Light Source, Harwell Science and
'82 Innovation Campus (Didcot, UK) with a 3 GeV energy of the storage ring and 300 mA currents
'83 with top-up injection mode. All SR-XRF microscopy investigations reported herein were carried
'84 out on the microfocus spectroscopy beamline (I18)(67). The micro X-ray fluorescence (μ -XRF)
'85 elemental mapping were acquired at room temperature with an incident X-ray energy set to
'86 12 keV using an Si(111) monochromator and resulting in a X-ray photon flux of 2.10^{11} ph/s . The
'87 substantia nigra of each animal were collected from free-floating sections and mounted onto an
'88 X-ray transparent metal-free 4 μ m thickness Ultralene ® foil (SPEXCert Prep, Metuchen, NJ,
'89 U.S.A.) secured to a customized Polyetheretherketone (PEEK) holder ensuring contamination-
'90 free samples and reduced X-ray scattering contribution. The samples were affixed to a magnetic
'91 plate that connects to the sample stage. The 4-element Si drift Vortex ME4 energy dispersive
'92 detector (Hitachi Hi-Technologies Science America) with Xspress-3 processing electronics, was
'93 operated in the 90° geometry, as such it minimizes the background signal. The sample-detector
'94 distance was fixed (75 mm). The sample was held at 45° to the incident X-ray beam and rastered
'95 in front of the beam whilst the X-ray fluorescence spectra were collected. An area of 500 μ m x
'96 500 μ m within the substantia nigra pars compacta (SNpc) was mapped for each sample with a
'97 step-size that match the beam size (5 μ m) and a dwell time of 1 s per pixel due to low
'98 concentration of the element. A thin (100 μ m) pellet of the NIST standards reference materials
'99 SRM1577c (bovine liver material, NIST, Gaithersburg, MD, USA) was measured to calibrate
'00 experimental parameters as well as a thin-film XRF reference material (AXO Dresden GmbH).
'01 This was followed by elemental quantification through the open-source software PyMCA(68) in

which both the reference material and the sample are modelled in terms of main composition, density and thickness. The fluorescence spectrum obtained from each pixel was fitted, the elemental concentration ($\mu\text{g/g}$ dry weight or ppm) maps were generated and an average elemental concentration of the SNpc regions was obtained.

Measurement of α -synuclein in monkey biological fluids samples

Multi-Array 96-well plates (MesoScale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) were coated with $30\mu\text{l}$ $3\mu\text{l/ml}$ MJFR1 (abcam, Cambridge, UK) as capture antibody and incubated overnight at 4°C without shaking. The next day plates were washed 3 times with $150\mu\text{l}$ PBS-T [PBS (AppliChem, Darmstadt, Germany) supplemented with 0,05% Tween-20 (Roth, Karlsruhe, Germany)] per well. Unspecific binding of proteins was prevented by incubation with $150\mu\text{l}$ 1% BSA (SeraCare Life Sciences, Milford, MA, USA)/PBS-T/well for 1 hour and shaking at 700rpm. Calibrators (kindly provided by Prof. Omar El-Agnaf) were prepared from single use aliquots of α -synuclein ($1\mu\text{g/ml}$ stored at -80°C until use) and ranged from 25000pg/ml to $6,1\text{pg/ml}$ in serial fourfold dilutions. 1% BSA/PBS-T served as blank. For the different specimen the following dilutions were applied: 1 in 10000 for whole blood and 1 in 8 for serum, plasma and CSF. All dilutions were prepared in 1% BSA/PBS-T. After washing the plates $25\mu\text{l}$ calibrator solutions and diluted samples were applied to the wells and incubated as indicated above. Plates were washed again and $25\mu\text{l}$ Sulfo-TAG labeled Syn1 antibody (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) diluted to $1\mu\text{g/ml}$ in 1% PBS-T were applied to the wells as detection antibody. Sulfo-TAG labeling was done according to the manufacturer's instruction using MSD Sulfo-TAG NHS-Ester (MSD). Incubation was for 1 hour at 700rpm. Plates were washed, $150\mu\text{l}$ 2x Read Buffer (MSD) was applied and the plates were read on a MSD SectorImager 2400. Data analysis was performed using WorkBench software (MSD).

Neurotransmitter analysis

Brain patches were dissected out on ice-cold plate, weighed and put into 1.5 ml Eppendorf tubes. Samples were homogenized in methanol/water (50:50% v/v), then centrifuged at 14000 rpm for 15 min at 4°C (69). The supernatant was aliquoted and stored at -80°C until amino acid derivatization. Glutamate and GABA content in the samples was measured by HPLC coupled with fluorometric detection (FP-2020 Plus fluorimeter, Jasco, Tokyo, Japan) after precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde/mercaptoethanol (OPA) reagent(70). Thirty microliters of OPA reagent were automatically added to $28\mu\text{L}$ sample by a refrigerated autosampler kept at 4°C

36 (Triathlon, Spark Holland, Emmen, The Netherlands). Fifty microliters of the mixture were
37 injected onto a 5-C18 Hypersil ODS column (3 X 100 mm; Thermo-Fisher, USA) perfused at
38 0.48 mL/min (Jasco PU-2089 Plus Quaternary Pump; Jasco, Tokyo, Japan) with a mobile phase
39 containing 0.1 M sodium acetate, 10% methanol, 2.2% tetrahydrofuran (pH 6.5). Chromatograms
40 were acquired and analysed using a ChromNav software (Jasco, Tokyo, Japan). Under these
41 conditions, the limits of detection for glutamate and GABA were ~1 nM and ~0.5 nM, and their
42 retention times ~3.5 min and ~18.0 min, respectively.

43

44 **Multiple-Layer Perceptrons**

45 Each Multiple-layer Perceptron (MLP) had the same architecture rule: 3 neurons as input, 3
46 neurons in the hidden layer and 3 neurons as output. Activation function of neurons was the
47 hyperbolic tangent. Each network was trained over 1,000 presentations of a subset of the dataset.
48 We used as error measure the mean square of differences between the expected output and the
49 actual output. Our implementation comprises two parameters: a learning rate set at
50 0.05 (regulating the learning speed), and a momentum set at 0.05 (introducing purposefully a
51 conservatism bias). Prior to learning, inputs were first scaled and centered (z scoring) in order to
52 avoid dimensionality issues and then normalized between -0.5 and 0.5. For every combination of
53 3 variables used as inputs, 50 instances of MLP were trained with different subsets of the
54 dataset. 80% of available data has been used for learning and the remaining 20% for testing the
55 performance of the network (elements of each subset were randomly (and uniformly) drawn for
56 each network). The performance from a given set of input variables was the mean of the error of
57 the 50 instances of MLP that had data for these variables as inputs. Code was written using
58 Python and the Python scientific stack(71-73) (Jones, 2001; Walt, 2011; Hunter, 2007). The
59 code is fully available here (DOI: 10.5281/zenodo.1240558). Computation has been done using
60 the Avakas cluster of the Mesocentre de Calcul Intensif Aquitain (MCIA). Rank-rank
61 hypergeometric overlap (RRHO) test was performed as previously described(74) using RRHO
62 package (1.14.0) in R(75) on variable list after ranking between experimental groups. Plotting
63 was made using matplotlib in Python environment.

64 The association metric was based on lift calculation. Let a and b be the two variables and n_x the
65 number of combinations including variable x and n the total number of combinations considered
66 in the analysis. Lift calculation was then:

67

$$\text{Lift}_{ab} = \frac{n_{ab}}{n_a} / \frac{n_b}{n}$$

168 The lift calculation was then corrected for performance to avoid selection of detrimental
169 association by being divided by the mean prediction error of the duo.

170

171 **Quantification and statistical analysis**

172 Regarding the data analysis for FTIR microspectroscopy, spectra were analyzed by Principal
173 Component Analysis (PCA). PCA is a multivariate statistical analysis technique that captures
174 independent sources of variance in the data and represents them in Principal Components
175 (eigenvectors) that carry the underlying spectral information and in a Score plot that shows the
176 relation between spectra and can be used to cluster the data based on the spectral information.
177 PCA were performed in The UnscramblerX 10.3 (Camo Software) using the SVD algorithm with
178 leverage correction. Two series of preprocessing were applied prior to PCA and compared.
179 Spectra were either baseline corrected in the amide I region between 1590 and 1700 cm^{-1} and
180 vector normalized, or their second derivatives were computed and vector normalized.

181 Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San
182 Diego, CA). For all experiments, comparisons among means were performed by using One-way
183 analysis of variance (ANOVA) followed, if appropriate, by a pairwise comparison between means
184 by Tukey *post-hoc* analysis. All values are expressed as the mean \pm standard error of the mean.
185 Size effect was assessed with Cohen's d analysis. In all analyses, statistical significance was set at
186 $p < 0.05$.

187

188

189

90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
00
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

REFERENCES

1. H. Braak *et al.*, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **24**, 197-211 (2003).
2. J. H. Kordower, Y. Chu, R. A. Hauser, T. B. Freeman, C. W. Olanow, Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* **14**, 504-506 (2008).
3. J. Y. Li *et al.*, Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* **14**, 501-503 (2008).
4. I. Mendez *et al.*, Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med* **14**, 507-509 (2008).
5. B. Dehay, M. Vila, E. Bezard, P. Brundin, J. H. Kordower, Alpha-synuclein propagation: New insights from animal models. *Mov Disord* **31**, 161-168 (2016).
6. A. Recasens, A. Ulusoy, P. J. Kahle, D. A. Di Monte, B. Dehay, In vivo models of alpha-synuclein transmission and propagation. *Cell Tissue Res*, (2017).
7. M. G. Spillantini *et al.*, Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840 (1997).
8. B. Winner *et al.*, In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4194-4199 (2011).
9. M. Bourdenx *et al.*, Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. *Prog Neurobiol* **155**, 171-193 (2017).
10. N. Bengoa-Vergniory, R. F. Roberts, R. Wade-Martins, J. Alegre-Abarrategui, Alpha-synuclein oligomers: a new hope. *Acta Neuropathol* **134**, 819-838 (2017).
11. A. Recasens *et al.*, Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol* **75**, 351-362 (2014).
12. K. C. Luk *et al.*, Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* **338**, 949-953 (2012).
13. L. A. Volpicelli-Daley *et al.*, Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* **72**, 57-71 (2011).
14. W. Peelaerts *et al.*, alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* **522**, 340-344 (2015).
15. E. Bezard *et al.*, Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**, 6853-6861 (2001).
16. R. L. Albin, A. B. Young, J. B. Penney, The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* **12**, 366-375 (1989).
17. G. Porras *et al.*, L-dopa-induced dyskinesia: beyond an excessive dopamine tone in the striatum. *Sci Rep* **4**, 3730 (2014).
18. M. Neumann, V. Muller, H. A. Kretschmar, C. Haass, P. J. Kahle, Regional distribution of proteinase K-resistant alpha-synuclein correlates with Lewy body disease stage. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 1225-1235 (2004).
19. E. Kovari *et al.*, Lewy body densities in the entorhinal and anterior cingulate cortex predict cognitive deficits in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* **106**, 83-88 (2003).
20. L. Silveira-Moriyama *et al.*, Regional differences in the severity of Lewy body pathology across the olfactory cortex. *Neurosci Lett* **453**, 77-80 (2009).
21. Y. C. Wong, D. Krainc, alpha-synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat Med* **23**, 1-13 (2017).

- 138 22. B. Dehay *et al.*, Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci* **30**,
139 12535-12544 (2010).
- 140 23. C. Cook, L. Petrucelli, A critical evaluation of the ubiquitin-proteasome system in
141 Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 664-675 (2009).
- 142 24. S. Kaushik, A. M. Cuervo, Proteostasis and aging. *Nat Med* **21**, 1406-1415 (2015).
- 143 25. E. C. Hirsch, S. Vyas, S. Hunot, Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism*
144 *Relat Disord* **18 Suppl 1**, S210-212 (2012).
- 145 26. D. T. Dexter *et al.*, Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in
146 Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia.
147 *Brain* **114 (Pt 4)**, 1953-1975 (1991).
- 148 27. K. Du, M. Y. Liu, X. Zhong, M. J. Wei, Decreased circulating Zinc levels in Parkinson's
149 disease: a meta-analysis study. *Sci Rep* **7**, 3902 (2017).
- 150 28. J. Y. Lee *et al.*, Cytosolic labile zinc accumulation in degenerating dopaminergic neurons
151 of mouse brain after MPTP treatment. *Brain Res* **1286**, 208-214 (2009).
- 152 29. C. T. Sheline, J. Zhu, W. Zhang, C. Shi, A. L. Cai, Mitochondrial inhibitor models of
153 Huntington's disease and Parkinson's disease induce zinc accumulation and are attenuated
154 by inhibition of zinc neurotoxicity in vitro or in vivo. *Neurodegener Dis* **11**, 49-58 (2013).
- 155 30. M. Bourdenx *et al.*, Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration
156 triggered by alpha-synuclein overexpression. *Acta Neuropathol Commun* **3**, 46 (2015).
- 157 31. G. Piatetsky-Shapiro, in *Knowledge Discovery in Databases*, G. Piatetsky-Shapiro, W. J.
158 Frawley, Eds. (AAAI/MIT Press, Cambridge, MA, 1991).
- 159 32. J. P. Bolam, E. K. Pissadaki, Living on the edge with too many mouths to feed: why
160 dopamine neurons die. *Mov Disord* **27**, 1478-1483 (2012).
- 161 33. D. J. Surmeier, J. A. Obeso, G. M. Halliday, Selective neuronal vulnerability in Parkinson
162 disease. *Nat Rev Neurosci* **18**, 101-113 (2017).
- 163 34. I. Carballo-Carbajal *et al.*, Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent
164 neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. *Nat Commun* **10**, 973
165 (2019).
- 166 35. J. A. Rodriguez *et al.*, Structure of the toxic core of alpha-synuclein from invisible
167 crystals. *Nature* **525**, 486-490 (2015).
- 168 36. M. D. Tuttle *et al.*, Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human
169 alpha-synuclein. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 409-415 (2016).
- 170 37. L. Bousset *et al.*, Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains.
171 *Nat Commun* **4**, 2575 (2013).
- 172 38. Y. Li *et al.*, Amyloid fibril structure of alpha-synuclein determined by cryo-electron
173 microscopy. *Cell Res*, (2018).
- 174 39. R. Guerrero-Ferreira *et al.*, Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *Elife* **7**, (2018).
- 175 40. M. Koch, Artificial Intelligence Is Becoming Natural. *Cell* **173**, 531-533 (2018).
- 176 41. D. M. Camacho, K. M. Collins, R. K. Powers, J. C. Costello, J. J. Collins, Next-
177 Generation Machine Learning for Biological Networks. *Cell* **173**, 1581-1592 (2018).
- 178 42. T. M. Malta *et al.*, Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with
179 Oncogenic Dedifferentiation. *Cell* **173**, 338-354 e315 (2018).
- 180 43. A. Esteva *et al.*, Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural
181 networks. *Nature* **542**, 115-118 (2017).
- 182 44. L. I. Kuncheva, J. J. Rodriguez, On feature selection protocols for very low-sample-size
183 data. *Pattern Recognition* **81**, 660-673 (2018).
- 184 45. D. Castelvechi, Can we open the black box of AI? *Nature* **538**, 20-23 (2016).
- 185 46. E. Diguët *et al.*, Deleterious effects of minocycline in animal models of Parkinson's
186 disease and Huntington's disease. *Eur J Neurosci* **19**, 3266-3276 (2004).

- 87 47. E. Diguët, C. E. Gross, F. Tison, E. Bezard, Rise and fall of minocycline in
88 neuroprotection: need to promote publication of negative results. *Exp Neurol* **189**, 1-4
89 (2004).
- 90 48. R. Aron Badin, M. Vadori, E. Cozzi, P. Hantraye, Translational research for Parkinsons
91 disease: The value of pre-clinical primate models. *Eur J Pharmacol* **759**, 118-126 (2015).
- 92 49. M. Ahmed *et al.*, Lentiviral overexpression of GRK6 alleviates L-dopa-induced
93 dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Sci Transl Med* **2**, 28ra28 (2010).
- 94 50. S. Fasano *et al.*, Inhibition of Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1)
95 signaling in the striatum reverts motor symptoms associated with L-dopa-induced
96 dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21824-21829 (2010).
- 97 51. G. Porras *et al.*, PSD-95 expression controls L-DOPA dyskinesia through dopamine D1
98 receptor trafficking. *J Clin Invest* **122**, 3977-3989 (2012).
- 99 52. N. M. Urs *et al.*, Targeting beta-arrestin2 in the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia
100 in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E2517-2526 (2015).
- 101 53. M. Bidinosti *et al.*, Novel one-step immunoassays to quantify alpha-synuclein:
102 applications for biomarker development and high-throughput screening. *J Biol Chem* **287**,
103 33691-33705 (2012).
- 104 54. G. Zandomenighi, M. R. Krebs, M. G. McCammon, M. Fandrich, FTIR reveals structural
105 differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci* **13**, 3314-
106 3321 (2004).
- 107 55. W. Dauer *et al.*, Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin
108 MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14524-14529 (2002).
- 109 56. J. Altmann, Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour* **49**, 227-267
110 (1974).
- 111 57. S. M. Camus, C. Blois-Heulin, Q. Li, M. Hausberger, E. Bezard, Behavioural profiles in
112 captive-bred cynomolgus macaques: towards monkey models of mental disorders? *PLoS*
113 *One* **8**, e62141 (2013).
- 114 58. S. M. Camus *et al.*, Birth origin differentially affects depressive-like behaviours: are
115 captive-born cynomolgus monkeys more vulnerable to depression than their wild-born
116 counterparts? *PLoS One* **8**, e67711 (2013).
- 117 59. S. M. Camus *et al.*, Depressive-like behavioral profiles in captive-bred single- and
118 socially-housed rhesus and cynomolgus macaques: a species comparison. *Front Behav*
119 *Neurosci* **8**, 47 (2014).
- 120 60. F. N. Soria *et al.*, Glucocerebrosidase deficiency in dopaminergic neurons induces
121 microglial activation without neurodegeneration. *Hum Mol Genet* **26**, 2603-2615 (2017).
- 122 61. P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium
123 thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159 (1987).
- 124 62. S. A. Bustin *et al.*, The MIQE guidelines: minimum information for publication of
125 quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**, 611-622 (2009).
- 126 63. K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time
127 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
- 128 64. E. A. Waxman, B. I. Giasson, Specificity and regulation of casein kinase-mediated
129 phosphorylation of alpha-synuclein. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 402-416 (2008).
- 130 65. N. N. Vaikath *et al.*, Generation and characterization of novel conformation-specific
131 monoclonal antibodies for alpha-synuclein pathology. *Neurobiol Dis* **79**, 81-99 (2015).
- 132 66. M. Helwig *et al.*, Brain propagation of transduced alpha-synuclein involves non-fibrillar
133 protein species and is enhanced in alpha-synuclein null mice. *Brain* **139**, 856-870 (2016).
- 134 67. J. F. Mosselmans *et al.*, I18--the microfocus spectroscopy beamline at the Diamond Light
135 Source. *J Synchrotron Radiat* **16**, 818-824 (2009).

- 136 68. V. A. Solé, Papillon, E., M. Cotte, P. Walter, J. Susini, A multiplatform code for the
137 analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part B:*
138 *Atomic Spectroscopy* **62**, 63-68 (2007).
- 139 69. D. M. de Freitas Silva, V. P. Ferraz, A. M. Ribeiro, Improved high-performance liquid
140 chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent
141 brain. *J Neurosci Methods* **177**, 289-293 (2009).
- 142 70. M. Marti, C. Trapella, R. Viaro, M. Morari, The nociceptin/orphanin FQ receptor
143 antagonist J-113397 and L-DOPA additively attenuate experimental parkinsonism through
144 overinhibition of the nigrothalamic pathway. *J Neurosci* **27**, 1297-1307 (2007).
- 145 71. E. Jones, E. Oliphant, P. Peterson, e. al. (2001).
- 146 72. S. van der Walt, S. C. Colbert, G. Varoquaux, The NumPy Array: A Structure for
147 Efficient Numerical Computation. *Computing in Science and Engineering* **13**, 22-30
148 (2011).
- 149 73. J. D. Hunter, Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in Science and*
150 *Engineering* **9**, 90-95 (2007).
- 151 74. S. B. Plaisier, R. Taschereau, J. A. Wong, T. G. Graeber, Rank-rank hypergeometric
152 overlap: identification of statistically significant overlap between gene-expression
153 signatures. *Nucleic Acids Res* **38**, e169 (2010).
- 154 75. R. C. Team, *R: A language and environment for statistical computing*. (R Foundation for
155 Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016).
- 156

157 **ACKNOWLEDGMENTS :** The authors wish to express their gratitude to Pr. Alan R. Crossman
158 (University of Manchester, UK) for his comments for his language supervision. We also thank Dr.
159 Marion Bosc (Cold Spring Harbor, USA) for valuable comments on the manuscript. The authors
160 thank Carmen Lagares Martínez (Head, Veterinary Service, University of Murcia) for
161 administrative assistance; Maria Fermina Ros Romero and Josefa Martínez Rabadán (University
162 of Murcia) for veterinary and husbandry support; Ana Luisa Gil, Lorena Cuenca and Ignacio
163 Mascarell from Clinical and Experimental Neuroscience group (University of Murcia) for their
164 technical help with various parts of the In Vivo part of these complex experiments. We would like
165 to thank Dr. Philippe Hantraye (MIRCen) for providing baboon stereotactic frame. The
166 University of Bordeaux and the Centre National de la Recherche Scientifique provided
167 infrastructural support.

168 **Funding:** This work was supported by a grant from the Michael J Fox Foundation (Project Grant
169 No. 2013-8499), Fundacion de Investigacion HM Hospitales (Madrid, Spain), the Fundación
170 Séneca (Project Grant No: FS19540/PI/14), the TARGET PD ANR grant and The Simone and
171 Cino Del Duca Prize from French Academy of Sciences. MB and MLA were supported by a
172 Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche fellowship and the France Parkinson
173 Foundation (MB). The help of the Bordeaux Imaging Center, part of the national infrastructure
174 France BioImaging, granted by ANR-10INBS-04-0, is acknowledged. The Human α -Synuclein
175 aggregation TR-FRET immunoassay was done in the Biochemistry and Biophysics Platform of

176 the Bordeaux Neurocampus at the Bordeaux University funded by the LABEX BRAIN (ANR-10-
177 LABX-43) with the help of Y. Rufin. Computing time for this study was provided by MCIA
178 (Mesocentre de Calcul Intensif Aquitain), the public research HPC-center in Aquitaine, France.
179 The samples were obtained from the Brain Bank GIE NeuroCEB (BRIF number 0033-00011),
180 funded by the patients' associations France Alzheimer, France Parkinson, ARSEP, and “Connaître
181 les Syndromes Cérébelleux” to which we express our gratitude. The synchrotron Diamond is
182 acknowledged for provision of beam time (exp. SP13009).

183 **Author contributions:** M.B., M.V., J.O., P.D., B.D. and E.B. conceived and designed the study.
184 M.B., G.P., I.T.D., C.E., N.G.C., M.T.H., B.D. and E.B. performed surgeries. S.C. and C.E.
185 performed behavioral analysis. M.G. set up the actimetry behavioral platform. S.D., A.P. and P.A.
186 performed histologic and immunohistochemical analysis of the data. S.D., A.P. and M.L.A.
187 performed imaging experiments. E.D. performed electron microscopy analysis. F.L., M.L.A. and
188 M.L.T. performed biochemistry experiments. C.P. performed and analyzed primary cultures
189 experiment. S.B. and B.D. performed synchrotron analysis. C.S. performed infrared microscopy.
190 N.K. and B.M. performed biological fluids analysis. S.N. and M.M. performed HPLC analysis.
191 T.L.L. performed mRNA extraction and qPCR analysis. M.B., A.N., S.D., M.L.A., S.C., N.P.R.,
192 S.B., C.S., F.L., N.K., B.M., S.N., M.M., C.P., A.R., N.N.V. and O.E.A., M.T.H., P.D., M.V.,
193 J.O., B.D. and E.B. analyzed the data. M.B., A.N. and N.P.R. developed the MLP approach.
194 M.B., M.V., J.O., B.D. and E.B. wrote the paper. B.D. and E.B. supervised the project. All
195 authors discussed the results, assisted in the preparation and contributed to the manuscript. All
196 authors approved the final version of the manuscript.

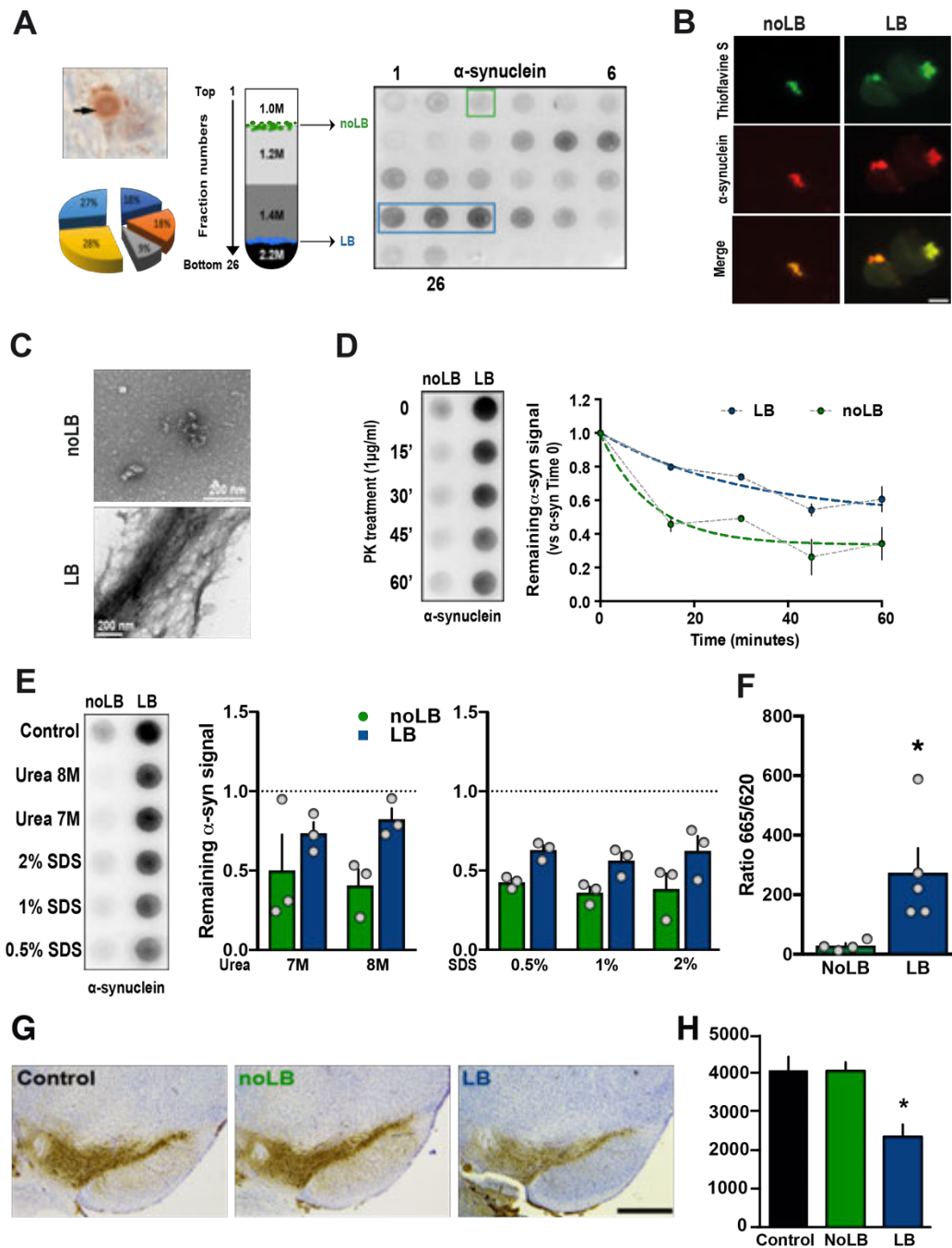
197 **Competing interests:** E. Bezard is a director and a shareholder of Motac neuroscience Ltd. All
198 the other authors have no conflict of interest to disclose.

199 **Data and materials availability:** The entire raw data set is made available to the readers (Table
00 S2). Authors chose not to provide representative examples of each procedure for the sake of space
01 and because the entire data set is fully disclosed. Further information and requests for examples
02 should be directed to and will be fulfilled by the Corresponding Contacts. Hyperlink to the
03 machine-learning code (10.5281/zenodo.1240558) is provided
04 (<https://zenodo.org/record/1240558#.XC8pqy17Su4>).

05
06

07

08 FIGURES



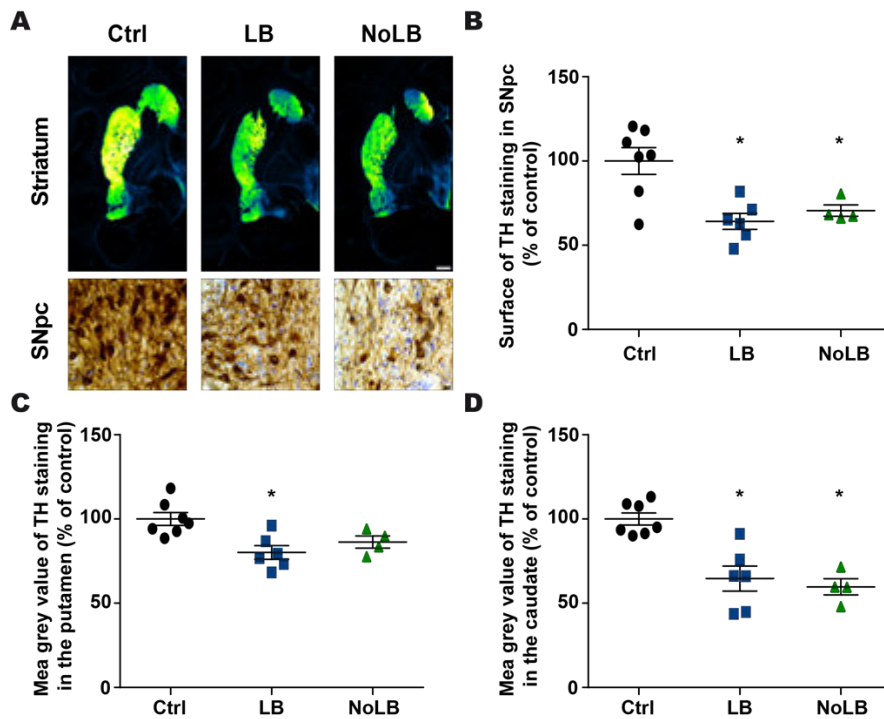
09

10

11 **Fig. 1. Purification and characterization of Lewy bodies (LB) and noLB inocula from**
 12 **Parkinson disease (PD) brains.** (A, left) Immunohistochemistry image of α -synuclein-positive
 13 LB (arrows) in nigral postmortem brain samples (PD #1; α -synuclein in brown, neuromelanin in
 14 dark-brown) before sucrose gradient purification. The pie chart indicates the relative contribution
 15 of the 5 patients to the final pool of LB and noLB inocula (A, middle) Schematic representation

16 of the sucrose gradient fractionation procedure used to purify LB/noLB-containing fractions from
17 freshly frozen postmortem nigral brain tissue of 5 sporadic PD patients. **(A, right)** Filter
18 retardation assay probed with a human α -synuclein antibody to assess the presence of α -synuclein
19 aggregates in the different fractions obtained by sucrose gradient fractionation from freshly frozen
20 postmortem nigral brain tissue from sporadic PD patients (PD #1). Green rectangle indicates
21 noLB-containing fraction and blue rectangle highlights LB-containing fraction selected to prepare
22 the mixture used for injections. **(B)** Confocal examination of purified noLB and LB fractions with
23 α -syn immunofluorescence (red) and thioflavin S staining (green). Both LB and noLB present
24 thioflavin S-positive aggregates but much smaller in noLB fractions. Scale bar = 10 μ m. **(C)**
25 Ultrastructural examination of noLB and LB fractions by electron microscopy showing massive
26 fibrils in LB fractions while noLB fractions contain, besides soluble α -syn, some punctiform
27 small size aggregates. **(D)** NoLB and LB fractions derived from PD brains (left panel) were
28 treated with 1 μ g/ml proteinase K for 0, 15, 30, 45 and 60 min and analyzed by immunoblotting
29 with syn211 antibody. The EC50 value was determined as the concentration at which this ratio is
30 decreased by 50%. The corresponding EC50 value for LB (>60 min) was approximately fourfold
31 greater than with noLB (15.23 min) **(E)** NoLB and LB fractions were treated for 6h with
32 increasing concentrations of either urea or SDS or buffer as control. Syn211 was used to detect
33 the forms of α -synuclein. The LB fractions appear to be more resistant to breakdown compared
34 with noLB fractions in both urea ($F_{(1,8)}=6.063$, $p=0.0392$) and SDS treatments ($F_{(1,12)}=17.41$,
35 $p=0.0013$). The dotted line show levels of control fractions. Comparison were made using Two-
36 Way ANOVA. **(F)** TR-FRET immunoassay analysis of noLB and LB fractions. Fluorescence
37 measurements were taken 20h after antibody. Analysis by unpaired Student's t-test ($t_{(7)}=2,623$,
38 $p=0,0343$). *: $P<0.05$. Mean \pm SEM, $n=4-5$. **(G)** Representative pictures of tyrosine hydroxylase
39 (TH)-positive substantia nigra pars compacta (SNpc) neurons (brown; Nissl staining in purple) in
40 non-injected, noLB or LB-injected mice at 4 months after injections. Scale bars=500 μ m. **(H)**
41 Quantification of TH-positive Substantia Nigra pars compacta (SNpc) neurons by stereology in
42 control, LB- and noLB-injected mice. Control mice, $n=10$, LB-injected mice at 4 months, $n=10$,
43 No-LB-injected mice at 4 months, $n=10$. One-way ANOVA followed by Tukey test for multiple
44 comparisons. *: $p<0.05$ compared with control and noLB-injected side at 4 months.

45



46
47
48 **Fig. 2. Intra-striatal injection of Lewy bodies (LB) and noLB fractions from Parkinson's**
49 **disease patients induces nigrostriatal neurodegeneration in baboon monkeys.** (A) Tyrosine
50 hydroxylase (TH) staining at striatum and Substantia Nigra pars compacta (SNpc) levels. A green
51 fire blue LUT (lookup table) was used to enhance contrast and highlight the difference between
52 non-injected, LB-injected and noLB-injected baboon monkeys at striatum level. Scale bars =
53 5mm (striatum) and 10 μ m (SNpc). (B) Scatter plot of TH immunostaining in SNpc. $F_{(2,14)}=9.439$,
54 $p=0.0025$. Control vs LB-injected: $p=0.0029$. Control vs noLB- injected: $p=0.0248$. (C, D) Scatter
55 plots of mean grey values of striatal TH immunoreactivity in the putamen ($F_{(2,14)}=7.313$,
56 $p=0.0067$; Control vs LB-injected: $p=0.0059$) (C) and in the caudate ($F_{(2,14)}=16.25$, $p=0.0002$;
57 Control vs LB-injected: $p=0.0008$; Control vs noLB- injected: $p=0.0008$) (D) in non-
58 LB-injected and noLB-injected baboon monkeys. The horizontal line indicates the average value
59 per group \pm SEM ($n=7$ from control animals; $n=6$ for LB-injected animals; $n=4$ for noLB-injected
60 animals). Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple
61 comparison. * $p < 0.05$ compared with control animals.

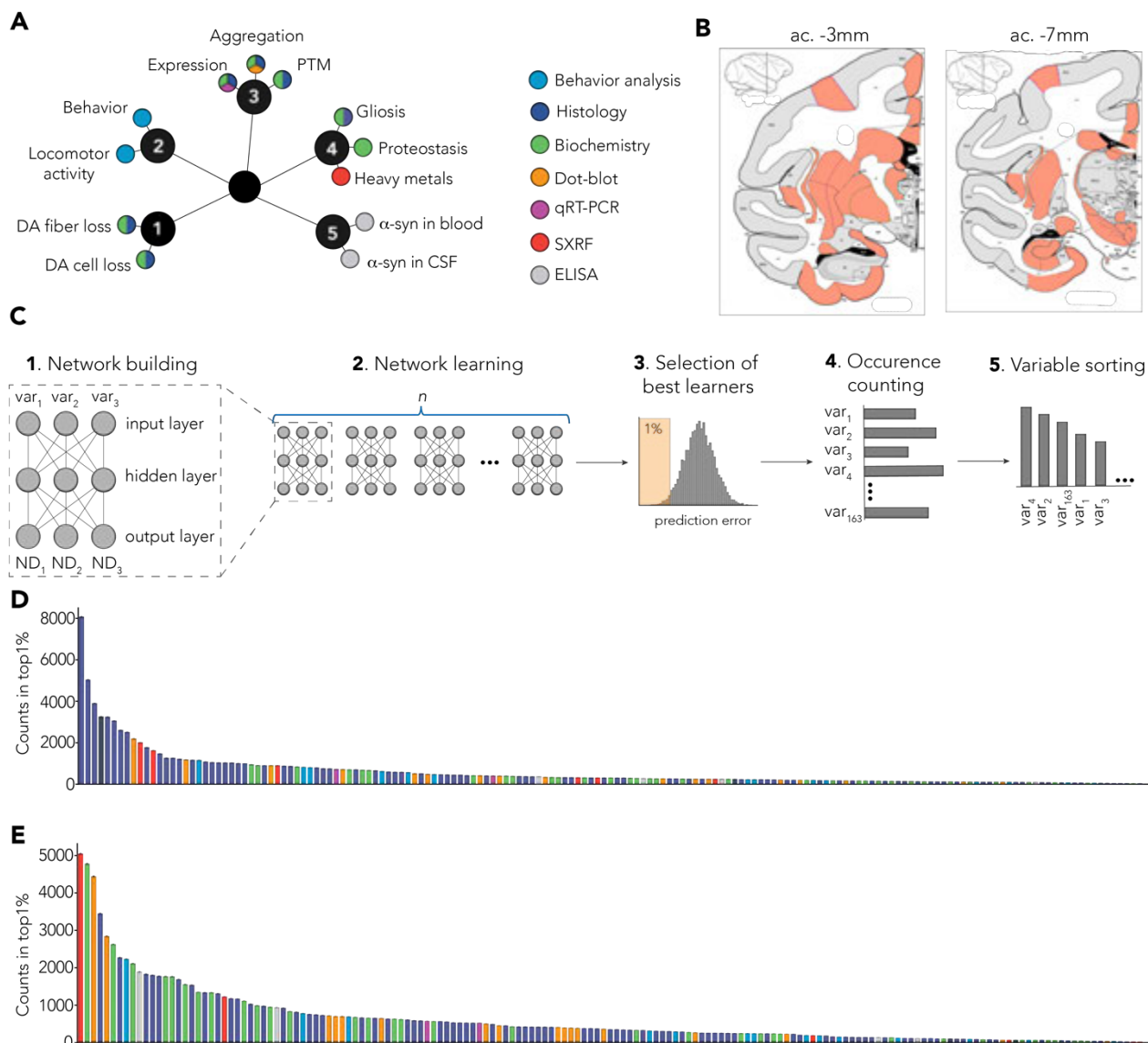
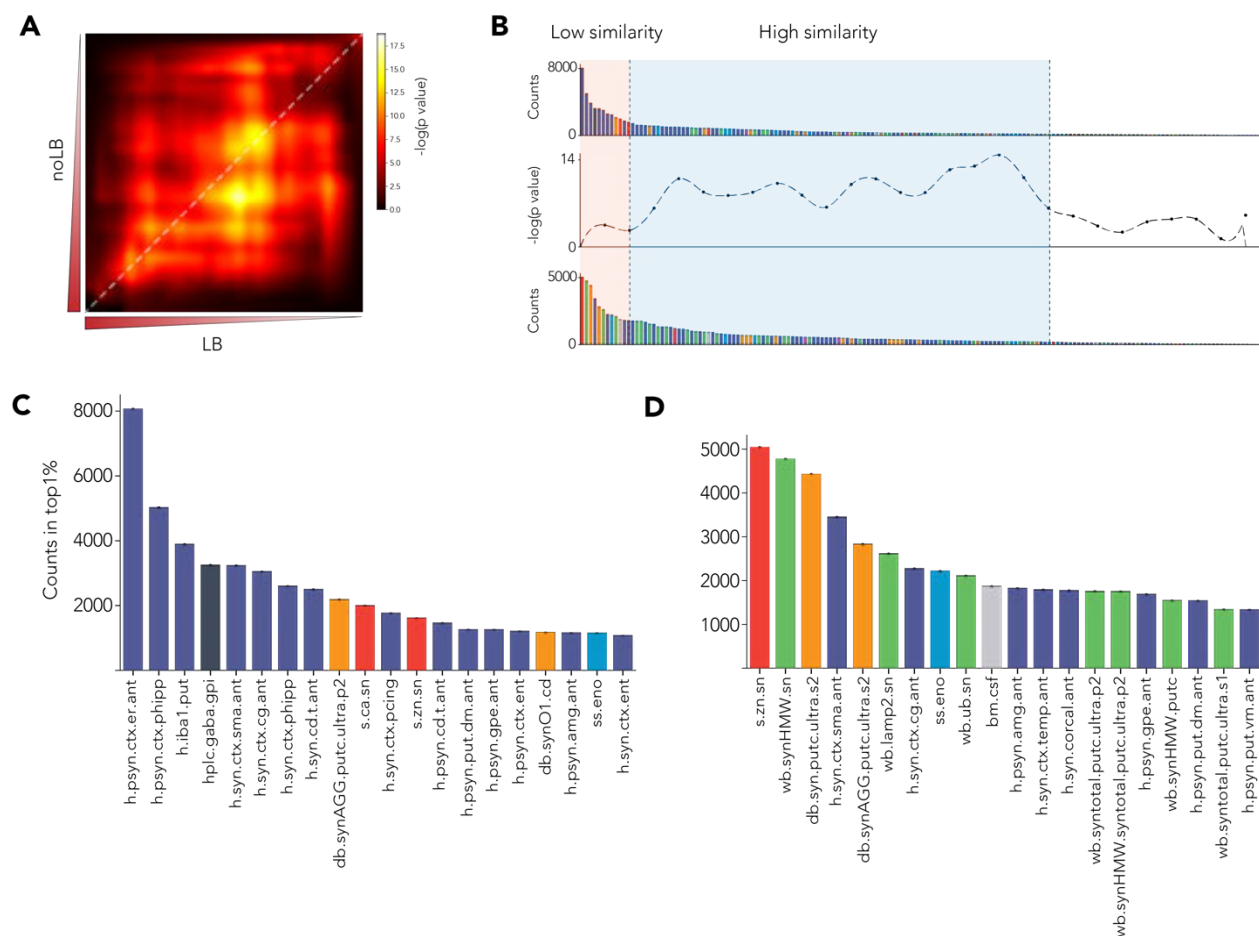


Fig. 3. Multiple-layer perceptron (MLP)-based identification of specific signature.

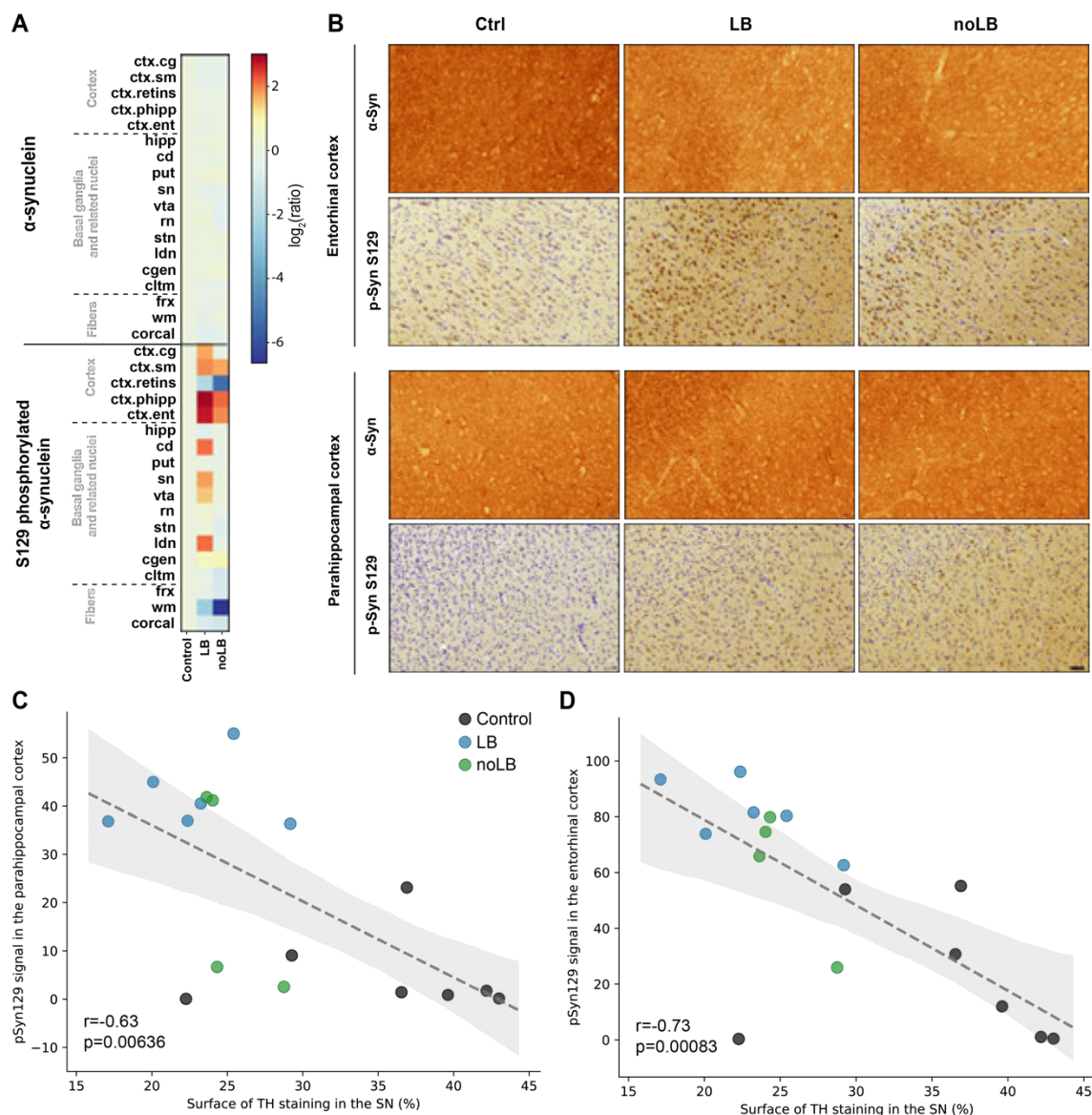
Several endpoints ($n=180$) were measured using multiple methods (colors). Endpoints can be grouped as clusters: 1. Dopaminergic degeneration, 2. Behavior, 3. α -syn-related pathology. 4. Non- α -syn related pathology. 5. Putative biomarkers. (B) Multiple brain regions ($n=40$) were investigated from coronal sections at 2 levels: anterior commissure (ac.) -3mm (striatum, entorhinal cortex) and -7mm (SNpc, hippocampus). (C) Detailed methodology. 1. Representative scheme of one MLP predicting 3 neurodegeneration-related variables (ND_1 , ND_2 , ND_3) with 3 experimental variables as input (var_1 , var_2 , var_3). Out of the 180 variables measured in total, 163 were used as inputs for the MLP. 2. One MLP was trained for every unique combination of 3 variables. 3. Combinations were ranked based on their prediction error and top1% were selected for further analysis. 4. Combinations were deconvoluted to extract single variables and count

76 occurrence of individual variables. 5. Variables were sorted based on the number of occurrences
 77 in the top1% of the best combination. **(D)** Raw ranking obtained for LB-injected animals. Color
 78 code highlights measurement methods as in A. **(E)** Raw ranking obtained for noLB-injected
 79 animals. Color code highlights measurement methods as in A.



82
 83 **Fig. 4. Direct comparison of MLP-derived signatures shows specific pattern between**
 84 **experiment groups. (A)** Rank-rank hypergeometric overlap (RRHO) test between variable
 85 sorting of LB and noLB-injected animals. Highly enriched variables are in the lower left corner.
 86 Diagonal (highlighted by a red dashed line) was extracted to do a bin-to-bin comparison between
 87 LB and noLB signatures. **(B)** Signatures were aligned with RRHO and show low similarity in
 88 highly enriched variables (light orange background) and higher similarity for lower rank variables
 89 (pale blue background). **(C, D)** First 20 enriched variables for both LB-injected animals **(C)** and
 90 noLB-injected animals **(D)**. Color code is similar to Fig. 2A. Detailed of variable names can be
 91 found in **Table S1**. Bars are mean +/- 99% confidence interval estimated by bootstrap.

92
 93



95

96 **Fig. 5. Levels of α -synuclein and phosphorylated α -synuclein in different brain regions. (A)**

97 Heat map representing the surface of α -synuclein (α -syn) and S129 phosphorylated α -syn

98 immunostaining intensity in the brain of non-inoculated, LB-inoculated and noLB-inoculated

99 baboon monkeys. The heat maps show all brain regions measured and are organized according in

100 3 main groups: cortical, basal ganglia and sub-cortical areas. From top to bottom: cingulate cortex

101 (*ctx.cg*), sensorimotor cortex (*ctx.sm*), retro-insular cortex (*ctx.retins*), parahippocampal cortex

102 (*ctx.phipp*), entorhinal cortex (*ctx.ent*), hippocampus (*hipp*), caudate nucleus (*cd*), putamen (*put*),

103 substantia nigra (*sn*), ventral tegmental area (*vta*), red nucleus (*rn*), subthalamic nucleus (*stn*),

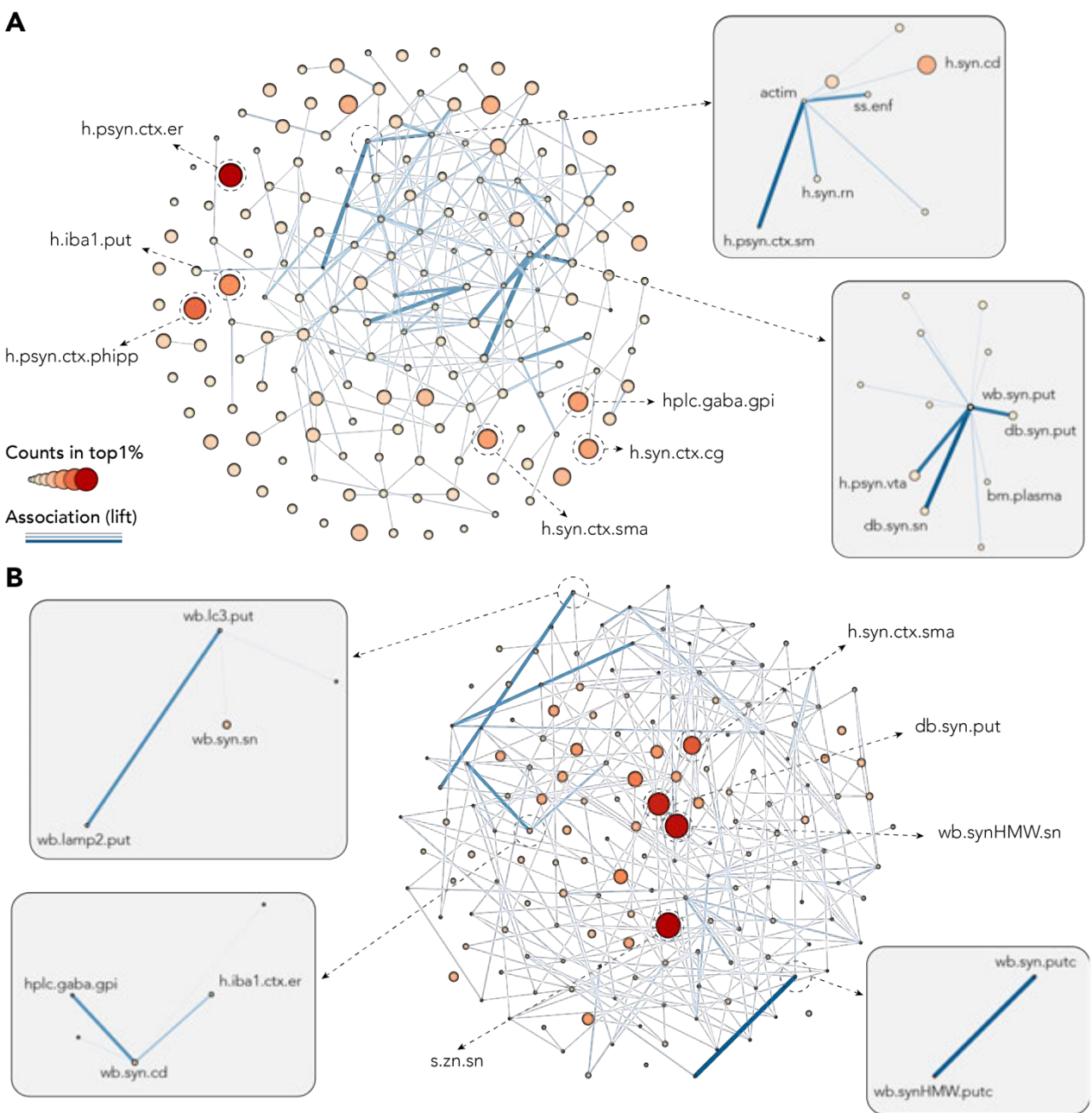
104 lateral dorsal nucleus (*ldn*), lateral geniculate nucleus (*cgen*), claustrum (*cltm*), fornix (*frx*), white

105 matter (*wm*), corpus callosum (*corcal*). The color bars represent the \log_2 value of the ratio of each

106 brain regions. (B) Representative pictures of α -syn (α -syn) and phosphorylated α -syn (pSyn

:07 S129) staining in the entorhinal and parahippocampal cortices. (C, D) Correlation between levels
 :08 of phosphorylated α -syn in the parahippocampal cortex (C) and the entorhinal cortex (D) with
 :09 levels of TH staining in the substantia nigra. Dotted line indicates the linear regression. Gray area
 :10 indicates the 95% confidence interval around of the linear regression.

:11
 :12
 :13



:14
 :15
 :16
 :17

Fig. 6. Association metric shows independence of strong predictors and beneficial association of weaker predictors. Both network plots were build using number of counts in the top1% as node size and color, and lift (association measure) as edges. To allow better

:18 visualization, only 10% of the strongest edges are shown. (A) Network plot for LB-injected
:19 animals showing independence of strong predictors: S129 phosphorylated α -syn (psyn) in the
:20 entorhinal (*h.psyn.ctx.er*) and the para-hippocampal cortex (*h.psyn.ctx.phipp*), microglia-
:21 activation in the putamen (*h.iba1.put*), α -syn in the cingulate cortex (*h.syn.ctx.cg*) and the
:22 supplementary motor area (*h.syn.ctx.sma*) and GABA levels in the internal part of the globus
:23 pallidus (*hlpc.gaba.gpi*). Upper right box highlights association between actimetry measure
:24 (*actim*) and a scan-sampling measure of body direction toward a closed environment (*ss.enf*) with
:25 α -syn levels in the caudate nucleus (*h.syn.cd*), the red nucleus (*h.syn.rn*) and psyn in the
:26 sensorimotor cortex (*h.psyn.ctx.sm*). Lower right box highlights association between pathological
:27 α -syn in the putamen (*wb.syn.put* and *db.syn.put*) and the SNpc (*db.syn.sn*) as well as psyn in the
:28 ventral tegmental area (*h.psyn.vta*) and peripheral levels of α -syn in the plasma (*bm.plasma*). (B)
:29 Network plot for noLB-injected animals showing independence of strong predictors: levels of Zn
:30 in the SNpc (*s.zn.sn*), pathological α -syn in the putamen (*db.syn.put*), α -syn in the supplementary
:31 motor area (*h.syn.ctx.sma*) and aggregated α -syn in the SNpc (*wb.synHMW.sn*). Upper left box
:32 highlights association between autophagosomes (*wb.lc3.put*) and lysosomes (*wb.lamp2.put*) levels
:33 in the putamen and α -syn in the SNpc (*wb.syn.sn*). Lower left box highlights association between
:34 GABA levels in the internal part of the globus pallidus (*hlpc.gaba.gpi*), α -syn in the caudate
:35 nucleus (*wb.syn.cd*) and microglia activation in the entorhinal cortex (*h.iba1.ctx.er*). Lower right
:36 box highlights association between soluble (*wb.syn.putc*) and aggregated (*wb.synHMW.putc*)
:37 levels of α -syn in the putamen.

:38

:39 **Supplementary Materials:**

:40 **Table S1.** List of variables used in multiple-layer perceptron analyses.

:41 **Table S2.** Raw data that served for the multiple-layer perceptron analyses for all behavioral,
:42 histological, biochemical, transcriptional and biophysical approaches (applied to several brain
:43 areas, totalizing the quantification of 180 variables for each individual).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

SUPPLEMENTAL FIGURES

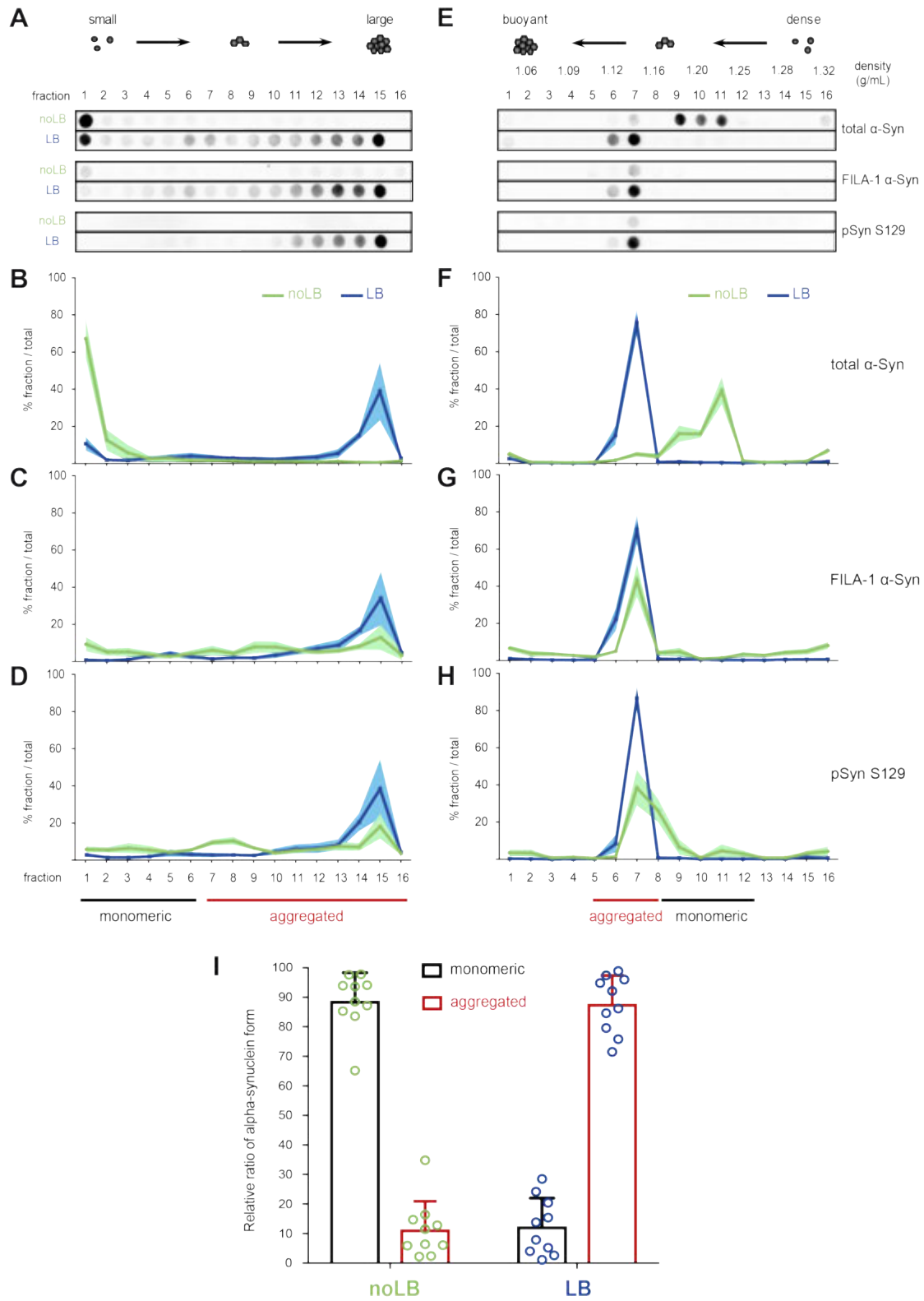


Fig. S1. Relative quantification of soluble and aggregated α -synuclein in noLB/LB fractions by velocity sedimentation and density floatation gradient fractionations. (A) Representative dot blots of the distribution of total α -synuclein (top, MJFR1 antibody, Abcam), FILA-1 α -synuclein aggregates (middle, MJFR14-6-4-2 antibody, Abcam) and phosphorylated pS129 α -synuclein (bottom, EP1536Y antibody, Abcam) on velocity sedimentation fractions (numbered from top to bottom of the gradient) for noLB (green) and LB (blue) fractions. (B-D) The relative amounts of total α -synuclein (B), FILA-1-positive α -synuclein (C) and pS129 α -synuclein (D) per fraction were quantified from noLB (green, n=5 PD patients) and LB (blue, n=5 same PD patients) velocity sedimentation fractionations. Mean curves (bold lines) with SEM (lighter shade areas) for each group. Velocity fractions containing soluble α -synuclein (1 to 6) are identified with a black line, while fractions containing aggregated insoluble α -synuclein (7 to 16) are identified with a red line. (E) Representative dot blots of total α -synuclein (top, MJFR1 antibody, Abcam), FILA-1 α -synuclein aggregates (middle, MJFR14-6-4-2 antibody, Abcam) and phosphorylated pS129 α -synuclein (bottom, EP1536Y antibody, Abcam) on density floatation gradient fractions (numbered from top to bottom of the gradient) for noLB (green) and LB (blue). (F-H) The relative amounts of total α -synuclein (F), FILA-1-positive α -synuclein (G) and pS129 α -synuclein (H) per fraction were quantified from noLB (green, n=5 PD patients) and LB (blue, n=5 same PD patients) equilibrium density floatation fractionations. Mean curves (bold lines) with SEM (lighter shade areas) for each group. Density fractions containing soluble α -synuclein (9 to 12) are identified with a black line, while fractions containing aggregated insoluble α -synuclein (5 to 8) are identified with a red line. (I) Relative ratios of soluble monomeric (velocity fractions 1-6 and density fractions 9-12) versus insoluble aggregated (velocity fractions 7-16, and density fractions 5-8) α -synuclein forms were calculated from each fractionation of noLB (green) and LB (blue) of each PD patient (n=5) and are represented respectively as black and red bars with SEM, together with individual values of each fractionation (n=5 velocities, n=5 densities).

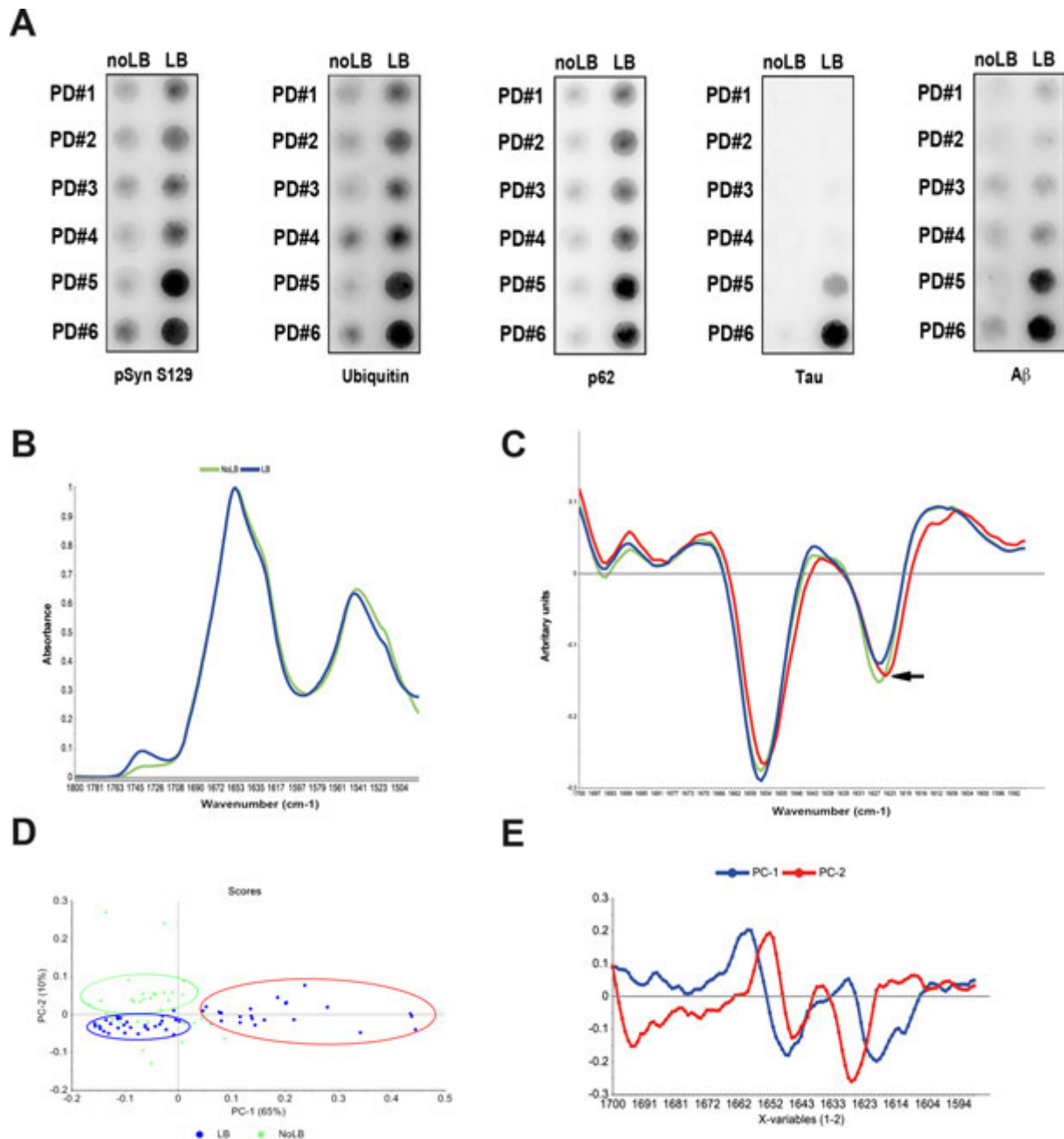


Fig. S2. Analysis of the amyloid structure of LB and noLB protein aggregates by infrared microspectroscopy. (A) Filter retardation assay of noLB and LB fractions probed with known components of LB: phosphorylated Ser129 α -syn (pSyn S129), ubiquitin, SQSTM1/p62, hyperphosphorylated tau and A β . Fractions were obtained by sucrose gradient fractionation from fresh frozen brain tissue from the sporadic PD patients used in this study (PD #1-5). (B). Mean spectra of LB (blue) and noLB (green) aggregates in the amide I and II bands. The spectra exhibited the typical amide I and amide II bands characteristic of protein samples. The amide I band in the two groups showed a strong shoulder at around 1630 cm^{-1} which is characteristic for the β -sheet component (C) Second derivative of the 3 groups separated by principal component analysis (PCA). A total of 37 no-LB and 53 LB vector normalized second derivative

spectra were analyzed. The second derivative spectra allowed finding the exact position of the β -sheet component at 1626.7 cm^{-1} . The $1627\text{ cm}^{-1}/1653\text{ cm}^{-1}$ ratio does not completely separate the 2 groups by the intensity of their amyloid signal. One group containing about 40% of the LB spectra (red ellipse) presented a higher amyloid signal than the rest of the LB spectra and a 2 cm^{-1} shift in the position of the amyloid peak (black arrow) (D) PCA score plot showing the clustering of the spectra in 3 groups (in ellipses) formed by principal components 1 (PC-1) and 2 (PC-2). The PCA score plot shows that most LB and no LB spectra cluster on the negative part of PC-1 axis while over 40% of the LB spectra cluster on the positive part of PC-1 axis (red ellipse). In the negative part of PC-1 axis, LB and noLB groups can be separated along the PC-2 axis (in the green and blue ellipses). (E) PCA loadings of PC-1 and PC-2. Loadings of the PC-1 (blue) showing peaks at 1658 , 1647 and 1620 cm^{-1} associated respectively with α -helices, random coil, and amyloid domains in the aggregates. Loadings of PC-2 (red) showing peaks at 1695 , 1652 , 1645 and 1628 cm^{-1} associated respectively with antiparallel β -sheet, α -helix, random coil, parallel β -sheet signal.

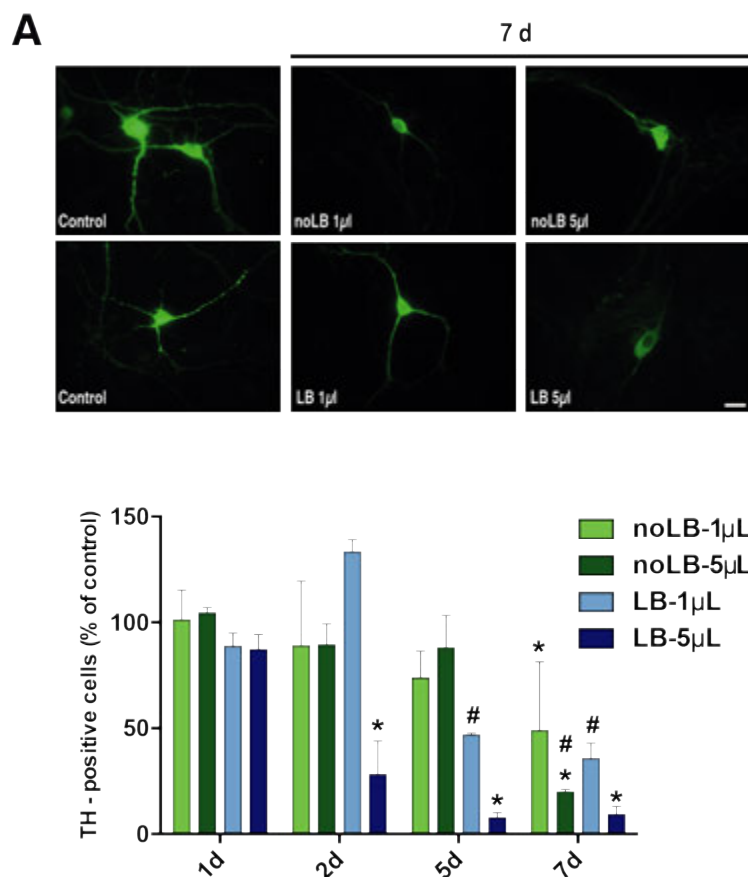


Fig. S3. *In vitro* and toxicity of Lewy bodies (LB) and noLB inocula from Parkinson disease (PD) brains. (A, top) In mouse primary mesencephalic culture, immunofluorescent labeling for tyrosine hydroxylase (TH) (green) following 7 days of treatment with $1\mu\text{l}$ and $5\mu\text{l}$ of noLB or LB fractions. Scale bars = $10\mu\text{m}$. (A, bottom) Number of TH-positive primary mesencephalic neurons following the different treatments at 1, 2, 5 and 7 days. Analysis by

Two-Way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons. In all panels, n=2-6 per experimental group. *: p<0.05 compared with 1d; #: p<0.05 compared with 2d.

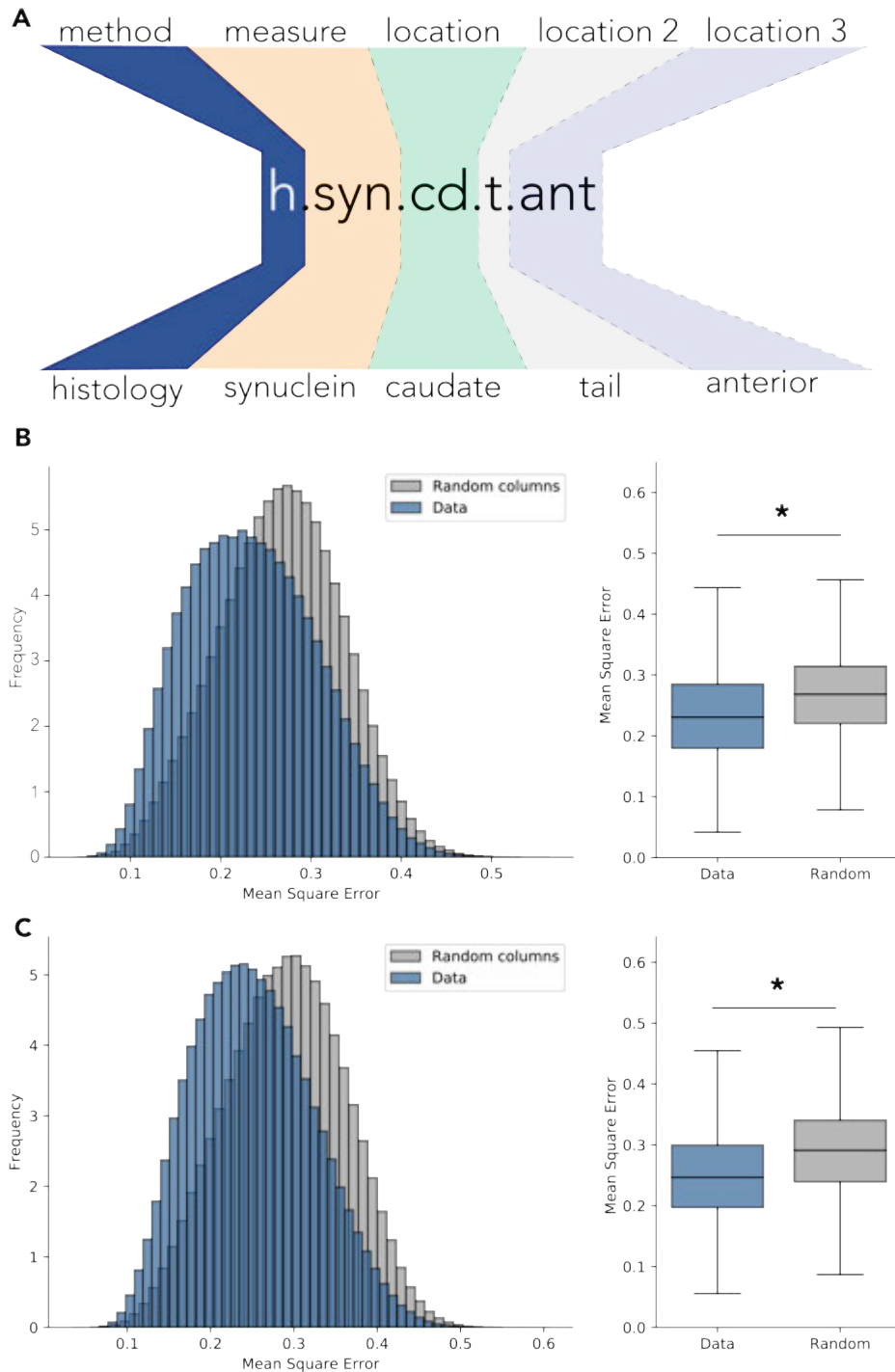


Fig. S4. Variable nomenclature and performances of multiple-layer perceptrons. (A) Guideline for variable naming. **(B, C)** A matrix of similar size filled with randomly generated values was used as control. **(B)** Data histogram for LB-injected group (left panel - blue) shows significant decrease (Cohen's $d=0.468$, $t=-278.755$, $p<10^{-6}$) in mean square error. Right panel shows similar data presented as boxplots. **(C)** Data histogram for noLB-injected group (left

panel - blue) shows significant decrease (Cohen's $d=0.543$, $t=-323.013$, $p<10^{-6}$) in mean square error. Right panel shows similar data presented as boxplots.

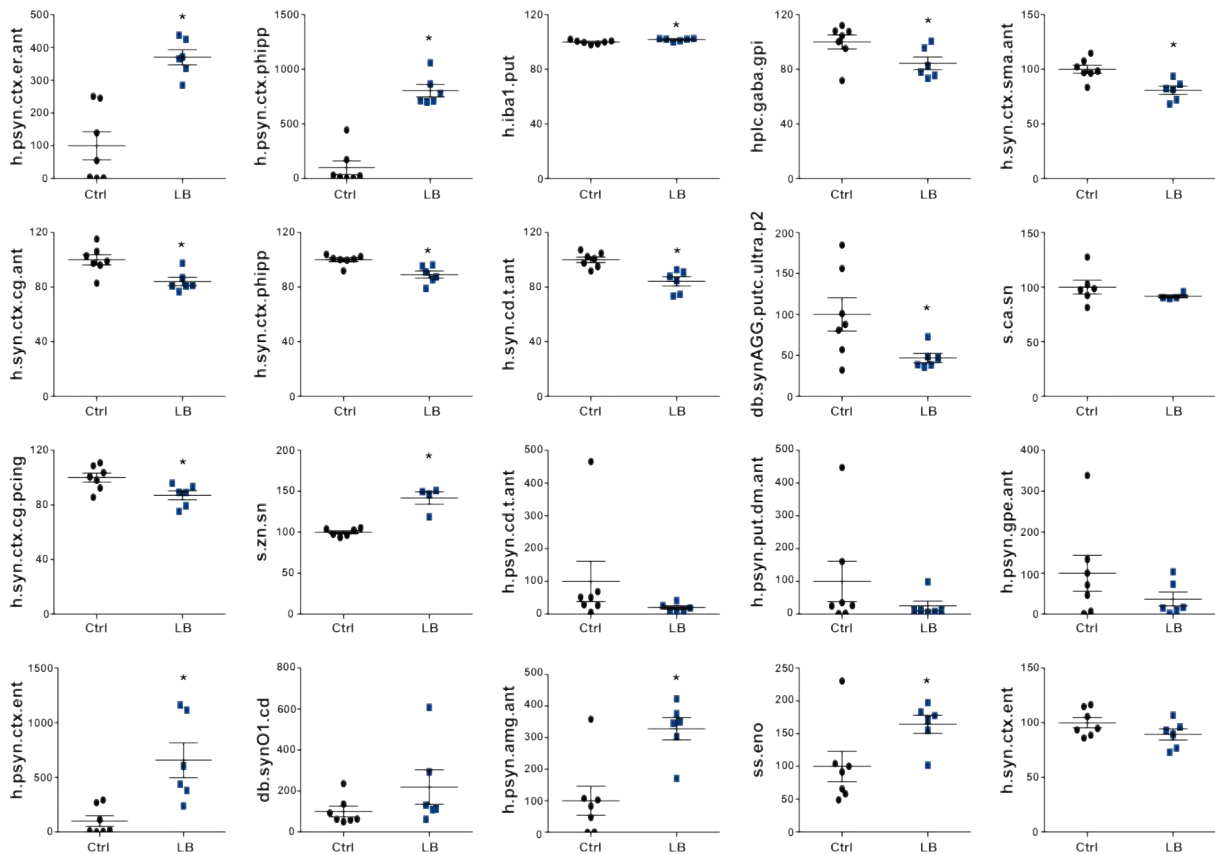


Fig. S5. Pathological MLP-derived signature of LB-exposed monkeys. Quantitative description of the 20 first-enriched variables for LB-injected animals highlighting a cortical-centric pattern: S129 phosphorylated α -syn (psyn) in the entorhinal (*h.psyn.ctx.er.ant*) [$t = 5.308$; $df = 11$; $p=0.0002$] and the para-hippocampal cortex (*h.psyn.ctx.phipp*) [$t = 8.256$; $df = 11$; $p<0.0001$], microglia activation in the putamen (*h.iba1.put*) [$t = 2.651$; $df = 11$; $p=0.023$], GABA levels in the internal part of the globus pallidus (*hplc.gaba.gpi*) [$t = 2.239$; $df = 11$; $p=0.047$], α -syn in the supplementary motor area (*h.syn.ctx.sma.ant*) [$t = 3.574$; $df = 11$; $p=0.004$], in the cingulate cortex (*h.syn.ctx.cg.ant*) [$t = 3.213$; $df = 11$; $p=0.008$], in the para-hippocampal cortex (*h.syn.ctx.phipp*) [$t = 3.688$; $df = 11$; $p=0.004$], and in the tail of the caudate nucleus (*h.syn.cd.t.ant*) [$t = 4.093$; $df = 11$; $p=0.002$], pathological α -syn in the putamen (*db.synAGG.putc.ultra.p2*) [$t = 2.345$; $df = 11$; $p=0.038$], levels of Ca in the SNpc (*s.ca.sn*) [$t = 1.058$; $df = 8$; $p=0.3211$], α -syn in the posterior cingulate cortex (*h.syn.ctx.pcing*) [$t = 2.719$; $df = 11$; $p=0.020$], levels of Zn in the SNpc (*s.zn.sn*) [$t = 6.389$; $df = 8$; $p=0.0002$], S129 phosphorylated α -syn (psyn) in the tail of the caudate nucleus (*h.psyn.cd.t.ant*) [$t = 1.186$; $df = 11$; $p=0.261$], S129 phosphorylated α -syn (psyn) in the dorsal part of the putamen

(*h.psyn.put.dm.ant*) [$t = 1.091$; $df = 11$; $p=0.298$], S129 phosphorylated α -syn (psyn) in the external part of the globus pallidus (*h.psyn.gpe.ant*) [$t = 1.261$; $df = 11$; $p=0.233$] and in the entorhinal cortex (*h.psyn.ctx.ent*) [$t = 3.563$; $df = 11$; $p=0.005$], aggregated α -syn in the caudate nucleus (*db.synO1.cd*) [$t = 1.452$; $df = 11$; $p=0.174$], S129 phosphorylated α -syn (psyn) in the amygdala (*h.psyn.amg.ant*) [$t = 3.813$; $df = 11$; $p=0.003$], a scan-sampling measure of body direction toward an open environment (*ss.eno*) [$t = 2.281$; $df = 11$; $p=0.043$], α -syn in the entorhinal cortex (*h.syn.ctx.ent*) [$t = 1.550$; $df = 11$; $p=0.149$]. The horizontal line indicates the average value per group \pm SEM ($n=7$ from control animals; $n=6$ for LB-injected animals). Comparison were made using non-parametric t-test analysis. * $p < 0.05$.

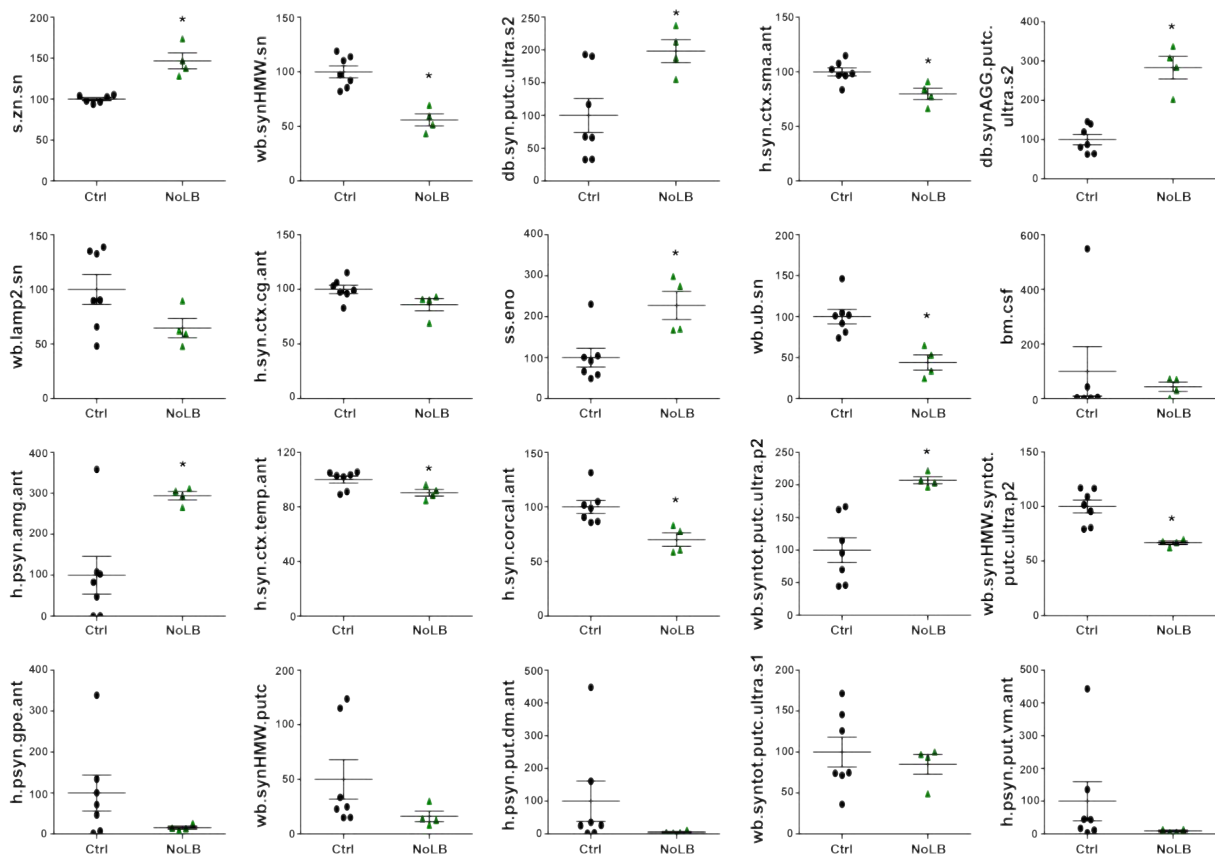


Fig. S6. Pathological MLP-derived signature of noLB-exposed monkeys. Quantitative description of the 20 first-enriched variables for noLB-injected animals illustrating a nigrostriatal-centric signature: levels of Zn in the SNpc (*s.zn.sn*) [$t = 5.735$; $df = 8$; $p=0.0004$], aggregated α -syn in the SNpc (*wb.synHMW.sn*) [$t = 2.280$; $df = 9$; $p=0.043$], pathological α -syn in the putamen (*db.syn.putc.ultra.s2*) [$t = 2.627$; $df = 9$; $p=0.028$], α -syn in the supplementary motor area (*h.syn.ctx.sma.ant*) [$t = 3.194$; $df = 9$; $p=0.011$], aggregated α -syn in the putamen (*db.synAGG.putc.ultra.s2*) [$t = 6.651$; $df = 9$; $p < 0.0001$], lysosomal levels in the SNpc

(*wb.lamp2.sn*) [t = 1.804; df = 9; p=0.105], α -syn in the cingulate cortex (*h.syn.ctx.cg.ant*) [t = 2.148; df = 9; p=0.060], a scan-sampling measure of body direction toward an open environment (*ss.eno*) [t = 3.182; df = 9; p=0.011], mono-ubiquitin levels in the SNpc (*wb.ub.sn*) [t = 4.098; df = 9; p=0.003], α -syn levels in the CSF (*bm.csf*) [t = 0.4991; df = 8; p=0.6311], S129 phosphorylated α -syn (psyn) in the amygdala (*h.psyn.amg.ant*) [t = 3.081; df = 9; p=0.013], α -syn in the temporal cortex (*h.syn.ctx.temp.ant*) [t = 2.451; df = 9; p=0.037] and in the corpus callosum (*h.syn.corcal.ant*) [t = 3.249; df = 9; p=0.010], pathological α -syn in the putamen (*wb.syntotal.putc.ultra.p2*) [t = 4.085; df = 9; p=0.003], aggregated α -syn in the putamen (*wb.synHMW.syntotal.putc.ultra.p2*) [t = 4.085; df = 9; p=0.003], S129 phosphorylated α -syn (psyn) in the external part of the globus pallidus (*h.psyn.gpe.ant*) [t = 1.428; df = 9; p=0.187], aggregated α -syn in the putamen (*wb.synHMW.putc*) [t = 1.367; df = 9; p=0.205], S129 phosphorylated α -syn (psyn) in the dorsal part of the putamen (*h.psyn.put.dm.ant*) [t = 1.131; df = 9; p=0.287], pathological α -syn in the putamen (*wb.syntotal.putc.ultra.s1*) [t = 0.5697; df = 9; p=0.583], S129 phosphorylated α -syn (psyn) in the ventromedial part of the putamen (*h.psyn.put.vm.ant*) [t = 1.124; df = 9; p=0.290]. The horizontal line indicates the average value per group \pm SEM (n=7 from control animals; n=4 for noLB-injected animals). Comparison were made using non-parametric t-test analysis. *p< 0.05, when compared with control animals.

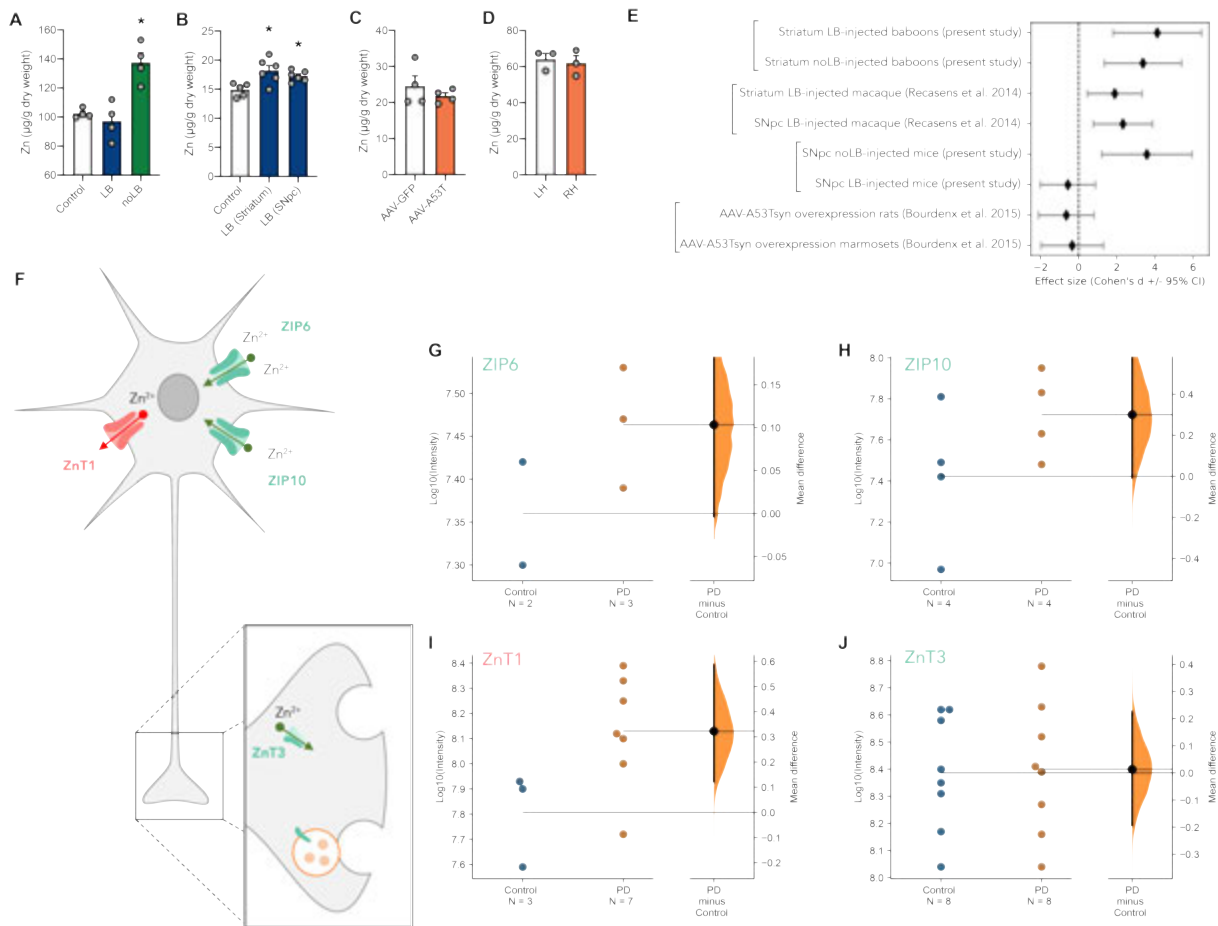


Fig. S7. Nigral Zinc levels in independent experimental cohorts. (A) Zinc levels in the substantia nigra of PD animal models in control, LB and noLB-injected mice (n=4 per group); (B) in control, striatum and SNpc LB-injected monkey macaques (5-6 nigral sections analyzed per animal); (C) in adeno-associated virus (AAV)-injected rats expressing either green fluorescent protein (AAV-GFP) or human mutant p.A53T α -synuclein (AAV-A53T) (n=4 per group); (D) in the left hemisphere (LH) or the right hemisphere (RH) of unilaterally injected marmoset monkeys (injection of AAV-A53T in the right hemisphere – n=3 per group). Data represent mean \pm SEM. Comparisons were made using One-Way ANOVA and Sidak's correction for multiple comparisons. *p < 0.05. (E) Metanalysis of the effect size of Zinc accumulation in the SNpc of animal cohort from the present study or from previous studies of our laboratory. Effect size is measured as the Cohen's d +/- 95% confidence interval (CI). (F) Schematic drawing showing the localization and function of the different transporters identified in the study. Levels of (G) Zrt/Irt-like protein (ZIP) 6, (H) ZIP10, (I) Zinc transporter (ZnT) 1 and (J) ZnT3 in the frontal cortex of healthy individual versus PD/DLB patients (n=2-8 per group). Data are shown using Gardner-Altman plots. The right part of the plot indicates the mean difference +/- 95% confidence interval, the curve indicates the resampled distribution of mean difference.

Projet 3 : Evaluation des taux de métaux dans la substance noire de différents modèles de synucléinopathie.

1. Contexte de l'étude :

L'approche par machine-learning chez le modèle primate non-humain présentée précédemment a permis de mettre en lumière le taux de zinc dans la substance noire comme étant le premier prédicteur de la neurodégénérescence chez le groupe noLB, et le douzième pour le groupe LB, suggérant l'implication d'une dyshoméostasie des métaux dans le processus neurodégénératif.

Dans la littérature, des études précédentes ont montré que de nombreux métaux interagissent directement avec l' α -syn au niveau des charges négatives de la protéine, augmentant ainsi son agrégation. Il a été montré notamment que les cations divalents tels que le fer (Fe^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}), le cobalt (Co^{2+}), le nickel (Ni^{2+}), le calcium (Ca^{2+}), le cuivre (Cu^{2+}) et le zinc (Zn^{2+}) se lient de manière préférentielle au niveau du C-terminale de la protéine (**Binolfi *et al.*, Journal of the American Chemical Society, 2006**, **Lowe *et al.*, Protein science : a publication of the Protein Society, 2004**, **Nielsen *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2001**, **Valiente-Gabioud *et al.*, Journal of Inorganic Biochemistry, 2012**). La présence de métaux accélère la formation de formes toxiques de la protéine (**Uversky *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2001**). La présence de la forme divalente du cuivre notamment induit la formation de conformères toxiques pour la cellule par des phénomènes accrue de seconde nucléation (**Rose *et al.*, Scientific reports, 2011**). De même, l'ajout de la forme trivalente du fer Fe^{3+} induit la formation d'oligomères cytosoliques insolubles qui perméabilisent les membranes lipidiques (**Kostka *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2008**). L'ajout de zinc accélère la formation de la forme fibrillaire de l' α -syn (**Valiente-Gabioud *et al.*, Journal of Inorganic Biochemistry, 2012**).

Ces données indiquent le rôle potentiel des métaux dans la toxicité de l' α -syn bien que le mécanisme d'action exact ne soit pas encore totalement élucidé.

2. Objectif de l'étude :

L'objectif de cette étude a été d'évaluer les niveaux de plusieurs métaux (zinc, fer, cuivre, calcium, soufre et manganèse) dans la substance noire de différents modèles de synucléinopathies.

3. Design expérimental :

Modèles de synucléinopathie utilisés dans cette étude :

- ❖ Souris ayant reçu une inoculation de fractions de corps de Lewy provenant de mésencéphales de patients parkinsoniens (groupe LB) à 4 mois post-injection. N = 4. **(Recasens *et al.*, Ann Neurol, 2014)**
- ❖ Souris ayant reçu une inoculation de fractions de corps de Lewy ne contenant pas l' α -syn agrégée, provenant de mésencéphales de patients parkinsoniens (groupe noLB) à 4 mois post-injection. N = 4. **(Recasens *et al.*, Ann Neurol, 2014)**
- ❖ Rat ayant reçu une injection du virus permettant l'expression de l' α -syn humaine mutée A53T ou celle de la GFP (contrôle) à 8 mois post-injection. N = 4. **(Bourdenx *et al.*, Acta neuropathologica communications, 2015)**
- ❖ Marmoset ayant reçu une injection du virus permettant l'expression de l' α -syn humaine mutée A53T à 11 mois post-injection. N = 3. **(Bourdenx *et al.*, Acta neuropathologica communications, 2015)**
- ❖ Macaque ayant reçu une inoculation de fractions de corps de Lewy provenant de mésencéphales de patients parkinsoniens (groupe LB) soit dans la substance noire, soit dans le striatum, soit dans le striatum après injection de MPTP, à 14 mois post-injection. N = 1 per condition. **(Recasens *et al.*, Ann Neurol, 2014)**
- ❖ Babouin ayant reçu une inoculation de fractions de corps de Lewy provenant de mésencéphales de patients parkinsoniens (groupe LB) à 6, 12 et 24 mois post-injection. N = 6 * 3.
- ❖ Babouin ayant reçu une inoculation de fractions de corps de Lewy ne contenant pas l' α -syn agrégée, provenant de mésencéphales de patients parkinsoniens (groupe NoLB) à 6, 12 et 24 mois post-injection. N = 6 * 3.

Mesure des concentrations de métaux dans la substance noire des animaux :

La mesure des métaux s'est effectuée via une méthode de microscopie à fluorescence X à rayonnement synchrotron (SR-XRF) au Diamond Light Source du Harwell Science and Innovation Campus (Didcot, Royaume-Uni) sur des cryosections de tissus de substance noire. Une pastille mince des matériaux de référence aux normes NIST SRM1577c (matériel de foie de bovin, NIST, Gaithersburg, MD, USA) a été utilisée pour étalonner les paramètres expérimentaux. Après acquisition des données sur la cartographie de la substance noire de chaque coupe, une quantification élémentaire via le logiciel open source PyMCA, dans lequel le matériau de référence et l'échantillon sont modélisés en termes de composition principale, de densité et d'épaisseur, a été

effectuée. Le spectre de fluorescence obtenu à partir de chaque pixel a été ajusté, les cartes de concentration élémentaire ($\mu\text{g} / \text{g}$ de poids sec ou ppm) et une concentration élémentaire moyenne de la substance noire ont été obtenues.

4. Résultats :

Nous avons ainsi mesuré les taux de zinc (Zn), fer (Fe), cuivre (Cu), calcium (Ca), soufre (S) et manganèse (Mn) dans la substance noire des différents modèles validés de synucléinopathies.

Chez les souris ayant reçu les fractions LB (α -syn agrégée) dans la substance noire droite, aucune modification dans la quantité de ces différents métaux n'a été observée (**Figure 34**). Concernant les souris ayant reçu les fractions noLB (α -syn non ou peu agrégée) dans la substance noire droite, une augmentation significative du taux de zinc et de cuivre est observée comparé au groupe contrôle, suggérant l'accumulation de ces deux métaux au sein de la substance noire (**Figure 34**).

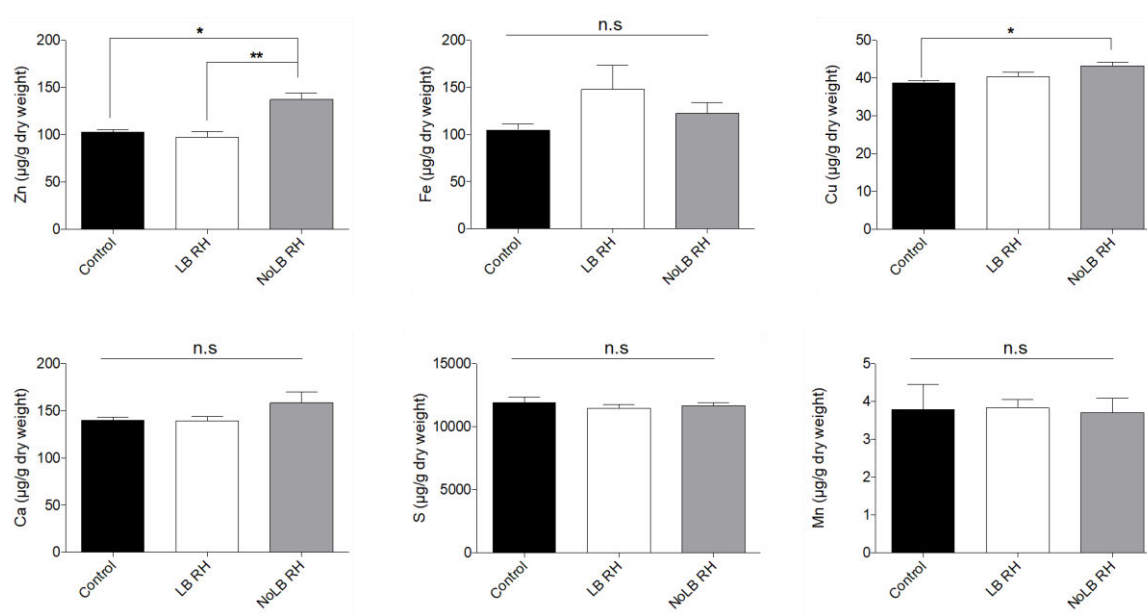


Figure 34 : Mesures des taux de zinc (Zn), fer (Fe), cuivre (Cu), calcium (Ca), soufre (S) et manganèse (Mn) dans la substance noire des souris contrôles ou inoculées avec les fractions LB (LB RH) et noLB (NoLB RH). Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA, n.s : non significatif, * $p < 0.05$ comparé au groupe contrôle.

Pour le modèle de rat exprimant l' α -syn humaine mutée en A53T (AAV2/9-A53TSyn), aucune différence dans les taux de ces métaux n'a été observée, comparé aux rats contrôles (AAV-GFP) (**Figure 35**).

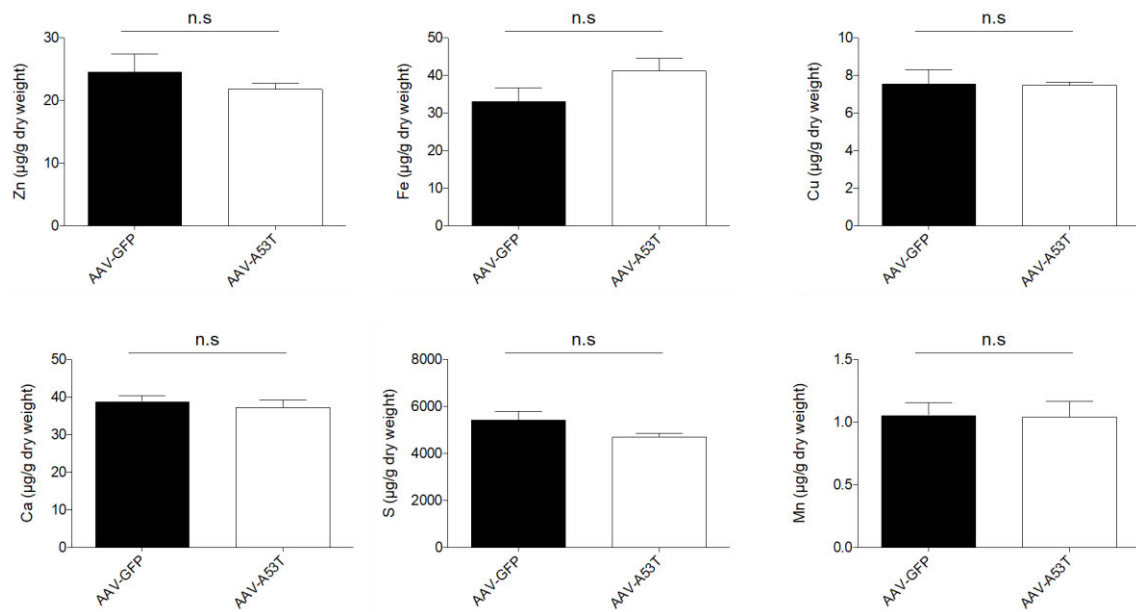


Figure 35 : Mesures des taux de zinc (Zn), fer (Fe), cuivre (Cu), calcium (Ca), soufre (S) et manganèse (Mn) dans la substance noire des rats exprimant l' α -synucléine humaine mutée en A53T (AAV-A53T) ou la GFP contrôle (AAV-GFP). Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA, n.s : non significatif.

Pour le modèle marmoset exprimant l' α -syn humaine mutée en A53T au niveau de la substance noire droite (RH), une accumulation de soufre et une diminution des taux de cuivre est observée, comparé au côté non injecté (LH) (**Figure 36**).

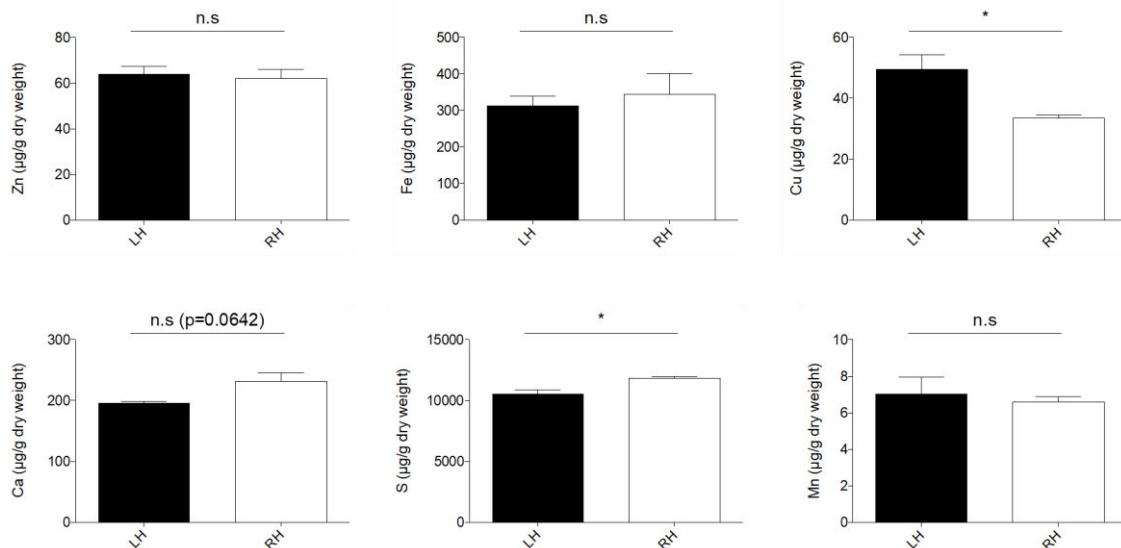


Figure 36 : Mesures des taux de zinc (Zn), fer (Fe), cuivre (Cu), calcium (Ca), soufre (S) et manganèse (Mn) dans la substance noire des marmosets exprimant l' α -synucléine humaine mutée en A53T (RH) comparé au côté non-injecté (LH). Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA, n.s : non significatif, *p<0.05 comparé au côté non-injecté (LH).

Concernant les macaques ayant reçu une inoculation de fractions LB dans la substance noire, une augmentation des taux de zinc, fer et une diminution des taux de cuivre est observée, comparé aux macaques contrôles non injectés. Les macaques ayant reçu une inoculation de fractions LB dans le striatum montrent une diminution du fer et du cuivre et une augmentation du zinc, comparé aux macaques contrôles non injectés. Enfin, les macaques préalablement rendus MPTP ayant reçu une inoculation de fractions LB dans le striatum démontrent d'une accumulation du fer et une diminution du cuivre comparé aux macaques contrôles non injectés. **(Figure 37)**

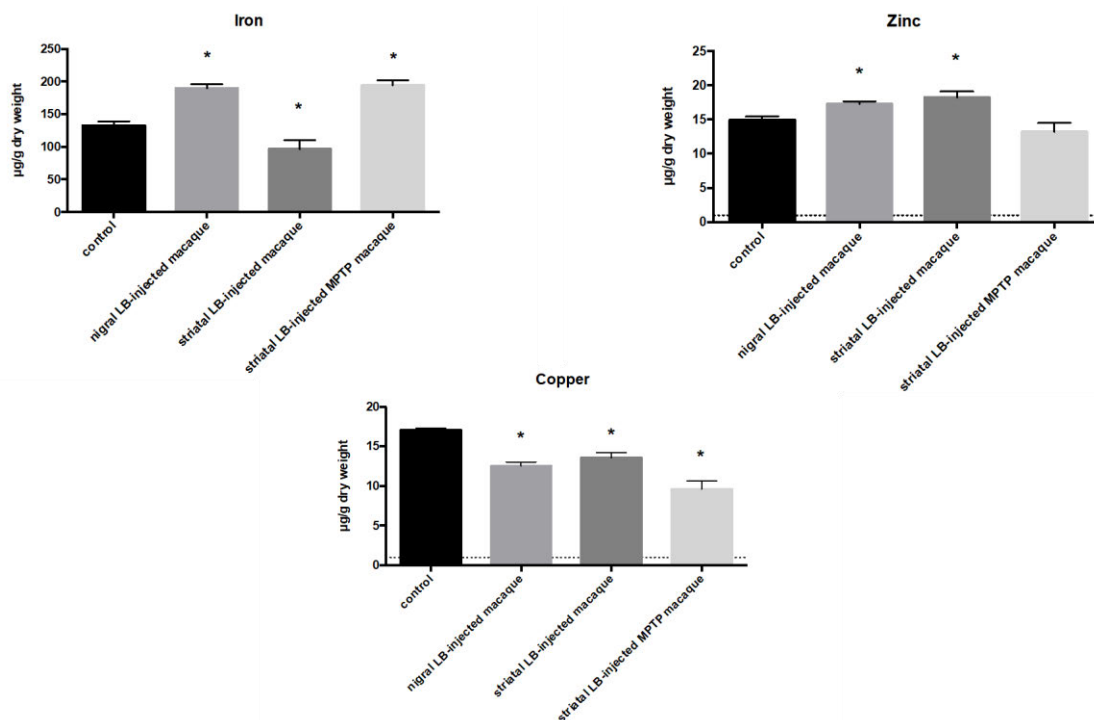


Figure 37 : Mesures des taux de fer, zinc et cuivre dans la substance noire des macaques inoculés avec les fractions LB au niveau nigral, striatal seul ou striatal préalablement injecté au MPTP. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA, n.s : non significatif, * $p < 0.05$ comparé au groupe contrôle.

Enfin, les babouins ayant reçu les fractions LB (α -syn agrégée) ou noLB (α -syn peu agrégée) provenant de mésencéphales de patients parkinsoniens comme décrit dans le projet 2 présentent une accumulation du zinc, statistiquement significative à 24 mois post-injection **(Figure 38)**.

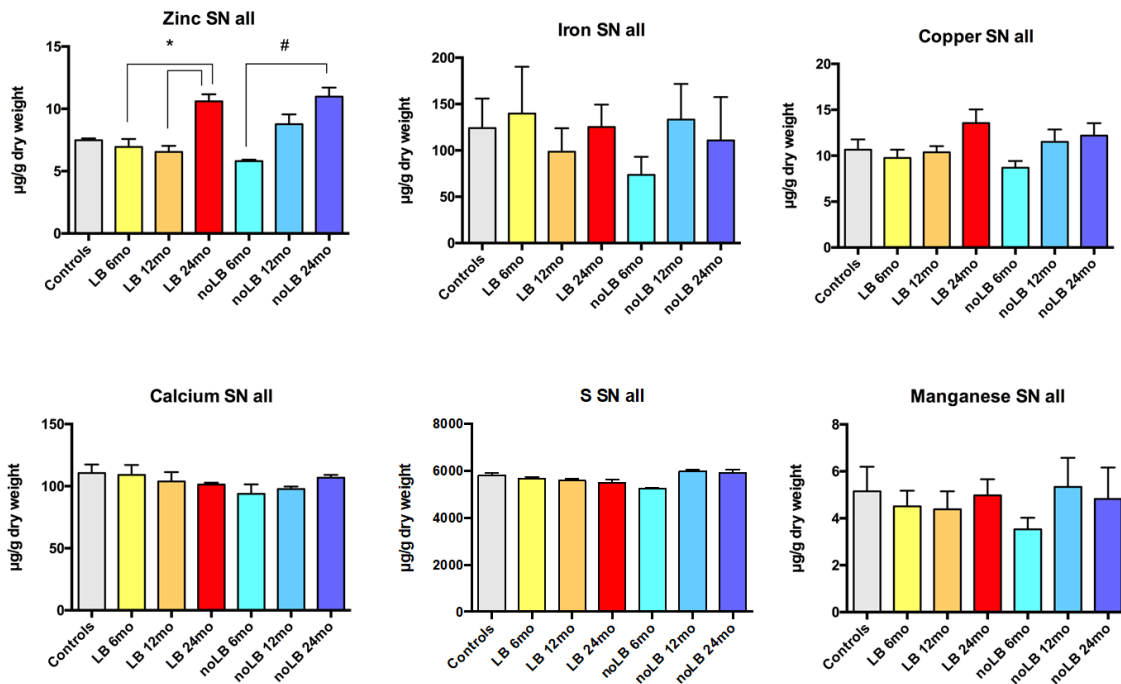


Figure 38 : Mesures des taux de zinc (Zn), fer (Fe), cuivre (Cu), calcium (Ca), soufre (S) et manganèse (Mn) dans la substance noire des babouins contrôles ou inoculés avec les fractions LB et NoLB à 6, 12 et 24 mois post-inoculation. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA, n.s : non significatif, * $p < 0.05$ comparé au groupe contrôle.

5. Discussion :

Ces résultats démontrent qu'une altération des taux de différents métaux est présente dans les modèles de synucléinopathie, aussi de manière différentielle entre eux, suggérant une corrélation entre l'homéostasie des métaux et la synucléinopathie.

De manière intéressante, le zinc s'accumule dans la substance noire des souris et des babouins ayant reçu l'inoculation de fractions noLB ne contenant pas d' α -syn agrégée. Cette reproductibilité inter-espèce et le fait que le zinc s'est avéré être le meilleur prédicteur de la neurodégénérescence observée chez les babouins noLB (projet n°2) suggère un rôle important de l'homéostasie du zinc dans les mécanismes de toxicité cellulaire liée à l' α -syn. Des études supplémentaires pour comprendre les mécanismes liant le zinc et l' α -syn sont aujourd'hui en cours au sein du laboratoire afin de confirmer et d'étayer ces premiers résultats.

Enfin, certains modèles de synucléinopathies ne présentent aucune altération des taux de métaux étudiés, soulevant la question de la nature de l'inoculum et la durée d'incubation qui peut s'avérer trop courte pour atteindre ce phénomène dans ces cas-là.

6. Conclusion :

Cette étude met en avant le rôle des métaux dans les synucléinopathies, notamment celui du zinc. Cependant, des études ultérieures sont nécessaires pour en connaître le mécanisme exact et la direction du lien de cause à effet entre les taux de métaux et l'accumulation d' α -syn.

Projet 4 : Etude de la propagation de la protéine α -synucléine entre le système nerveux central et le système nerveux entérique.

Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of α -synuclein pathology in non-human primates

Auteurs: **Marie-Laure Arotcarena**^{1,2,14}, Sandra Dovero^{1,2,14}, Alice Prigent^{3,14}, Mathieu Bourdenx^{1,2,14,§}, Sandrine Camus^{1,2}, Gregory Porras^{1,2}, Marie-Laure Thiolat^{1,2}, Maddalena Tasselli³, Philippe Aubert³, Niels Kruse⁴, Brit Mollenhauer⁴, Ines Trigo Damas^{5,6}, Cristina Estrada^{7,8}, Nuria Garcia-Carrillo⁹, Nishant N. Vaikath¹⁰, Omar M. A. El-Agnaf¹⁰, Maria Trinidad Herrero^{7,8}, Miquel Vila^{6,11,12,13}, Jose. A. Obeso^{5,6}, Pascal Derkinderen³, Benjamin Dehay^{1,2*#} and Erwan Bezdard^{1,2*#}

¹⁴ Ces auteurs ont contribué de manière équivalente à ce travail.

Revised manuscript under review.

Nous nous sommes ici intéressés à la propagation de la protéine α -syn entre le système nerveux central et le système nerveux entérique.

La dysfonction gastro-intestinale apparaît chez la majorité des patients parkinsoniens avec la constipation comme symptôme majeur (**Edwards *et al.*, Neurology, 1992**). L'équipe de Braak a suggéré que le point d'initiation de la maladie de Parkinson est localisé au niveau du noyau dorsal du nerf vague X (DMnX) (**Braak H, Neurobiology of Aging, 2002**), c'est-à-dire dans la partie caudale du système nerveux central. Des inclusions d' α -syn sont observées au niveau du système nerveux entérique en post-mortem chez les patients parkinsoniens, étayant l'idée d'une origine entérique de la synucléinopathie (**Beach *et al.*, Acta Neuropathol, 2010, Braak *et al.*, Neurosci Lett, 2006**). Expérimentalement, une propagation caudo-rostrale de la synucléinopathie a été mise en lumière après injection de formes synthétiques d' α -syn ou de vecteurs viraux exprimant l' α -syn dans le tractus gastro-intestinal, via une route de propagation vagale (**Holmqvist *et al.*, Acta Neuropathol, 2014, Manfredsson *et al.*, Neurobiol Dis, 2018, Uemura *et al.*, Mol Neurodegener, 2018, Ulusoy *et al.*, Acta Neuropathol, 2017, Ulusoy *et al.*, EMBO Mol Med, 2013**). Cependant, l'hypothèse de l'origine entérique de la maladie de Parkinson reste à ce jour encore débattue (**Lionnet *et al.*, Acta Neuropathol, 2018**). Nous avons ainsi souhaité répondre à cette problématique en évaluant la direction de propagation de la protéine α -syn et les routes de propagation potentielles entre le système nerveux central et entérique. Nous avons émis l'hypothèse alternative que la protéine α -syn pourrait se propager du système nerveux central vers

le système nerveux entérique (de manière caudale) en plus d'une propagation du système nerveux entérique vers le système nerveux central (de manière rostrale).

Nous avons ainsi testé cette hypothèse par l'utilisation de deux groupes expérimentaux de babouins (*Papio papio*) ayant reçu une inoculation de fraction LB provenant de mésencéphales de patients parkinsoniens soit dans le putamen ou soit dans la paroi ventrale de l'estomac. Par des approches immunohistochimiques et biochimiques, nous avons analysé la neurodégénérescence au niveau du système nerveux central et la synucléinopathie au niveau des systèmes nerveux central et entérique. Nous avons également analysé la synucléinopathie présente dans le nerf vague et dans les fluides biologiques.

Cette étude a démontré, pour la première fois, une route bidirectionnelle de propagation de la protéine α -syn entre le système nerveux central et le système nerveux entérique. La voie de transfert par le nerf vague est remise en doute par les résultats obtenus sur ce modèle de synucléinopathie puisqu'aucune accumulation d' α -syn pathologique n'a pu être mise en évidence dans les sections vagales des deux groupes expérimentaux. Nous avons cependant observé une corrélation positive entre les taux d' α -syn dans le plasma et dans le système nerveux entérique, ouvrant la voie à de possibles nouvelles routes de propagation par les fluides biologiques.

En conclusion, cette étude a permis d'apporter de nouvelles preuves d'une propagation centrale-périphérique de la protéine α -syn, étayant l'hypothèse dite « prion-like » concernant les synucléinopathies. L'initiation entérique de la maladie de Parkinson est remise en doute par ce travail puisque les données obtenues indiquent l'existence d'une propagation bidirectionnelle de la protéine entre le système nerveux central et entérique. Enfin, une route de propagation vagale ne semble pas être impliquée dans la propagation entre ces deux systèmes mais cette étude amène des preuves de potentielles routes alternatives par les fluides biologiques. De futures études concernant les mécanismes de propagation de la synucléinopathie sont nécessaires pour établir si un mécanisme de propagation directe de cellule à cellule ou indirecte via des facteurs externes sont impliqués dans ce phénomène.

**Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of α -synuclein
pathology in non-human primates**

Marie-Laure Arotcarena^{1,2,14}, Sandra Dovero^{1,2,14}, Alice Prigent^{3,14}, Mathieu Bourdenx^{1,2,14,S}, Sandrine Camus^{1,2}, Gregory Porras^{1,2}, Marie-Laure Thiolat^{1,2}, Maddalena Tasselli³, Philippe Aubert³, Niels Kruse⁴, Brit Mollenhauer⁴, Ines Trigo Damas^{5,6}, Cristina Estrada^{7,8}, Nuria Garcia-Carrillo⁹, Nishant N. Vaikath¹⁰, Omar M. A. El-Agnaf¹⁰, Maria Trinidad Herrero^{7,8}, Miquel Vila^{6,11,12,13}, Jose. A. Obeso^{5,6}, Pascal Derkinderen³, Benjamin Dehay^{1,2*#} and Erwan Bezard^{1,2*#}

¹ Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France; ² CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France; ³ Inserm, U1235, Nantes F-44035, France; Nantes University, Nantes F-44035, France; CHU Nantes, Department of Neurology, Nantes F-44093, France; ⁴Paracelsus-Elena-Klinik, Kassel, Germany; University Medical Center Goettingen, Institute of Neuropathology, Goettingen, Germany; ⁵HM CINAC, HM Puerta del Sur and CIBERNED and CEU-San Pablo University Madrid, E-28938 Mostoles, Spain; ⁶Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Instituto Carlos III, Spain; ⁷Clinical and Experimental Neuroscience Unit, School of Medicine, Biomedical Research Institute of Murcia (IMIB), University of Murcia, Campus Mare Nostrum, 30071 Murcia, Spain; ⁸Institute of Research on Aging, School of Medicine, University of Murcia, 30071 Murcia, Spain; ⁹Centro Experimental en Investigaciones Biomédica (CEIB), Universidad de Murcia, Murcia, Spain; ¹⁰Neurological Disorders Research Center, Qatar Biomedical Research Institute (QBRI), Hamad Bin Khalifa University (HBKU), Education City, Qatar; ¹¹Neurodegenerative Diseases Research Group, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR)-Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Barcelona, Spain; ¹²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Autonomous University of Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; ¹³Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Barcelona, Spain; ¹⁴These authors contributed equally to this work.

*Correspondence should be addressed to: Dr. Benjamin Dehay and to Dr. Erwan Bezard, Institute of Neurodegenerative Diseases, Université de Bordeaux, CNRS UMR 5293, Centre Broca Nouvelle-Aquitaine, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. E-mail: benjamin.dehay@u-bordeaux.fr (B.D.) and erwan.bezard@u-bordeaux.fr (E.B.)

EB and BD are co-last authors

^S Present address: Albert Einstein College of Medicine. Department of Developmental and Molecular Biology. 1300 Morris Park Ave. Bronx, NY, 10461, USA.

Manuscript information: 19 text pages; 2 figures; 12 supplementary figures; 1 supplementary table.

A BRIEF UNREFERENCED ABSTRACT (3 SENTENCES, NO MORE THAN 70 WORDS) 70

In Parkinson's disease, synucleinopathy is hypothesized to spread from the enteric nervous system, via the vagus nerve, to the central nervous system. Here we show that patient-derived α -synuclein aggregates are able to induce nigrostriatal lesions and enteric nervous system pathology after either enteric or striatal injection in a primate model. This suggests that the progression of α -synuclein pathology might be either caudo-rostral or rostro-caudal, varying between patients and disease subtypes.

TEXT (1000- 1500 WORDS) 1528

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disease characterized by classical motor features, but non-motor manifestations are common well before diagnosis can be established. Gastrointestinal (GI) symptoms occur in the majority of PD patients and constipation is among the most common early symptoms^{1,2}. Autopsy studies have consistently shown that Lewy bodies (LB) and neurites, two main histological hallmarks of the neurodegeneration, are found in the enteric nervous system (ENS) in nearly every case examined³. Based on the topographic distribution of LB, Braak and coworkers posited that PD pathology may begin in the GI tract then spread to the brain via the vagus nerve^{4,5}. This hypothesis is supported by experimental data showing that misfolded α -synuclein, which is the main component of LB, can transfer from gut to brain either after viral vector delivery of α -synuclein or recombinant α -synuclein preformed fibrils injected into the GI tract⁶⁻¹⁰. However, in these experimental models, no severe synucleinopathy or neurodegeneration was observed, which might be explained by either the time of examination after injection (a maximum of one year) and/or the pathogenic nature of the material used. Although appealing, the so-called 'Braak hypothesis' is still widely debated¹¹. We, therefore, set out to examine a possible alternative scenario in which α -synuclein aggregation might not only spread rostrally but also

caudally, i.e. both from the gut to the brain and also from the brain to the gut. We hypothesized that, in non-human primates, the striatal or ENS injection of α -synuclein-containing LB extracts from PD patients might result in ENS and central nervous system (CNS) pathologies, respectively. Here, we compare, in baboon monkeys (n=4-6 per experimental group), the pathological consequences of either intrastriatal or enteric injection of LB-enriched fractions containing pathological α -synuclein, purified from postmortem PD patient brains. LB-enriched fractions are composed (90%) of insoluble aggregated, detergent and proteinase K-resistant α -synuclein co-localizing with the β -sheet-rich structures binding dye Thioflavin S¹².

Two years after administration, LB-injected monkeys displayed a loss of dopaminergic neurons and fibers regardless of the injection site (**Fig. 1A-D**) compared to age-matched control monkeys as previously reported^{12,13}. Injection of LB-enriched fractions in the ENS led to striatal dopaminergic loss, to the same extent as in striatum-injected animals (**Fig. 1A-D**). Both CNS and ENS injections resulted in loss of tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity in the substantia nigra, pars compacta (SNpc) and loss of striatal dopaminergic terminals; but these lesions remained below the threshold for the appearance of parkinsonian symptoms¹⁴. There was a relatively modest degeneration of the nigrostriatal pathway in ENS-injected animals compared to striatum-injected animals, suggesting that the LB-induced neurodegenerative process might have been ongoing and progressing more slowly in the former, corresponding to an early/premotor stage of PD (**Supplementary Fig. 1**). At 2 years, apart from an increased Iba1 immunoreactivity in the entorhinal cortex of the striatum-injected animals, no gross astrogliosis and microgliosis was observed in the CNS of LB-injected animals (**Supplementary Fig. 2**). To evaluate whether LB-induced neurodegeneration was associated with α -synuclein pathology, we quantified the expression levels of α -synuclein in twenty brain regions (**Fig. 1E - Supplementary Fig. 3**). We found mild differences in α -synuclein immunolabeling after both striatum and ENS injections compared to age-matched control monkeys, except for the

posterior part of the putamen, where a significant increase in α -synuclein signal was observed in both experimental groups. By contrast, the pathogenic form of α -synuclein, i.e. S129 phosphorylated α -synuclein, accumulated differently in the LB-injected animal groups (**Fig. 1E**). Striatum-injected animals exhibited a marked accumulation in the basal ganglia and various cerebral cortical areas, while accumulation was overall milder in ENS-injected monkeys (**Fig. 1E - Supplementary Fig. 4**). We then measured the content of α -synuclein aggregates using TR-FRET immunoassay and observed no differences in the three brain regions investigated in striatum-injected animals (**Supplementary Fig. 5A**). Using Syn-O1, an antibody specific for α -synuclein fibrils and oligomers¹⁵, we detected oligomeric and fibrillar forms of the protein in nigrostriatal regions in some LB-injected animals (**Supplementary Fig. 6**). As a whole, these findings suggest that enteric injection of LB-enriched fractions might induce α -synuclein pathology throughout the nigrostriatal tract, similar to that observed after striatal injection and confirm that α -synuclein pathology can propagate from the ENS to the CNS.

To assess whether the pathogenic effects of PD-derived LB extracts could also be observed throughout the ENS, we evaluated the presence of α -synuclein aggregation in the duodenum, close to the site of injection, and at a distance from the injection (in the fundus and the antrum). We first determined α -synuclein expression patterns in the monkey ENS, where we found that native α -synuclein is abundantly expressed in monkey enteric neurons, as shown by co-localization of α -synuclein with pan-neuronal markers (**Supplementary Fig. 7**). Then, using confocal microscopy, we observed a significant increase (~600%) in α -synuclein immunoreactivity in enteric neurons (i.e. neuron-specific enolase (NSE)-positive cells) in ENS-injected monkeys compared to age-matched controls (**Fig. 2A-B**). Even more interestingly, levels of α -synuclein accumulation in NSE-positive cells were also significantly increased in the striatum-injected group (**Fig. 2A-B**). The presence of α -synuclein aggregates in the fundus

and antrum was further assessed. While TR-FRET immunoassay showed no changes in experimental groups (**Supplementary Fig. 5B**), stomach samples from striatum- and ENS-injected animals contained aggregated α -synuclein as revealed by dot-blot assay using Syn-1 and Syn-O1 antibodies (**Supplementary Fig. 8**). These results confirm the presence of an enteric α -synuclein pathology after both intra-ENS or intra-striatal injections. Interestingly, there was a significant negative correlation between the intensity of α -synuclein immunoreactivity in enteric neurons and the TH immunoreactivity in the putamen (**Fig. 2C**) and in the SNpc (**Fig. 2D**), implying that a high α -synuclein level in enteric neurons correlated with the progressive destruction of the nigrostriatal pathway. These findings suggest that α -synuclein level in enteric neurons may reflect the severity of pathological changes occurring in the prodromal phase of patients with PD. This notion is supported by the findings of a study that the progressive loss of dopamine transporter in the caudate nucleus correlated significantly with progressive constipation symptoms¹⁶, raising the possibility that striatal dopaminergic denervation may have an instrumental role in the development of GI dysfunction in PD¹⁷. These results indicate that both striatal and ENS injections of LB-enriched fractions can induce α -synuclein pathology in the ENS. We have, thus, demonstrated the bidirectional long-distance propagation of α -synuclein pathology between the CNS and the ENS in the non-human primate. To investigate the precise route underlying such a propagation, we evaluated the presence of phosphorylated α -synuclein in the vagus nerve in LB-injected animals compared to controls (**Supplementary Fig. 9A**). No significant difference in S129 phosphorylated α -synuclein immunoreactivity was observed in the vagus nerve in LB-injected monkeys compared to age-matched controls (**Supplementary Fig. 9B-C**). The level of S129 phosphorylated α -synuclein in either the vagal nerve fibers (**Supplementary Fig. 9D**) or the vagal cells (**Supplementary Fig. 9E**) did not correlate with the α -synuclein immunoreactivity in enteric neurons and no increase in aggregated α -synuclein was observed in the vagus nerve of LB-injected monkeys

(**Supplementary Fig. 10A-B-C**). Next, we examined the pathological features of the α -synuclein and S129 phosphorylated- α -synuclein in the dorsal motor nucleus of the vagus (dmnX). We confirmed that it was present in choline acetyltransferase-positive neurons of the dmnX (**Supplementary Fig. 11**) but that injection of LB into the striatum or into the enteric nervous system did not induce synucleinopathy in the dmnX (**Supplementary Fig. 11**).

Although further experiments in vagatomized animals will be required, our results indicate that α -synuclein pathology is unlikely to occur through the vagal nerve in our experimental model. The fact that α -synuclein can also be detected in several body fluids ¹⁸, logically led us to measure the α -synuclein concentration in the monkey blood, which was preferentially chosen to avoid concerns about hemolysis. We observed a significantly higher concentration of α -synuclein in the whole blood (**Supplementary Fig. 9F**) in the ENS-injected monkeys, than in the controls. A similar observation was made in the serum of striatum-injected monkeys (**Supplementary Fig. 9G**). No significant difference was observed in the plasma (**Supplementary Fig. 9H**) or in the cerebrospinal fluid (**Supplementary Fig. 9I**). Interestingly, the α -synuclein concentration in the whole blood (**Supplementary Fig. 9J**) and in the plasma (**Supplementary Fig. 9K**) were positively correlated with α -synuclein immunoreactivity in enteric neurons. These observations suggest that circulating levels of α -Syn could reflect the initiation of synucleinopathy in the ENS or the brain and strengthen its predictive role as a biomarker. Whether these elevated levels of circulating α -Syn solely reflect the status of the pathology or contribute to the disease itself as a route propagation or transmission remain to be fully addressed.

In summary, our data provide evidence that both striatal and ENS injections of LB-enriched fractions in baboon monkeys induce nigrostriatal degeneration associated with α -synuclein pathology in both the CNS and the ENS (**Supplementary Table 1** features all raw data). Thus, our results reveal the existence of a bidirectional route of propagation of α -synuclein between

the CNS and the ENS (**Supplementary Fig. 12**) and within the ENS (i.e. stomach to duodenum). Our results further suggest that this propagation is unlikely to involve the vagus nerve at this time-point but instead a systemic mechanism, in which the general circulation acts as a possible route for long-distance bidirectional transfer of aggregated α -syn between the ENS and the CNS.

METHODS

Methods, including statements of data availability and any associated accession codes and references, are available in the online version of the paper.

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to Pr. Alan R. Crossman (University of Manchester, UK) for his comments for his advice on English grammar. The authors thank Carmen Lagares Martínez (Head, Veterinary Service, University of Murcia) for administrative assistance; Maria Fermina Ros Romero and Josefa Martínez Rabadán (University of Murcia) for veterinary and husbandry support; Ana Luisa Gil, Lorena Cuenca Bermejo and Ignacio Mascarell from the Clinical and Experimental Neuroscience group (University of Murcia) for their technical help with various parts of the in vivo part of these complex experiments. We would like to thank Philippe Hantraye (MIR Cen) for providing baboon stereotactic frame. The University of Bordeaux and the Centre National de la Recherche Scientifique provided infrastructural support. This work was supported by a grant from the Michael J Fox Foundation (Project Grant No. 2013-8499), Fundacion de Investigacion HM Hospitales (Madrid, Spain), the Fundación Séneca (Project Grant No: FS19540/PI/14), the TARGET PD ANR grant and The Simone and Cino Del Duca Prize from French Academy of Sciences. MB and MLA were supported by grants from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche fellowship and the France Parkinson Foundation (MB). AP and PD were supported by grants from CECAP (comité d'entente et de coordination des associations de parkinsoniens) and 'Parkinsoniens de Vendée'. The help of the Bordeaux Imaging Center, part of the national infrastructure France BioImaging, granted by ANR-10INBS-04-0, is acknowledged. The Human α -Synuclein

aggregation TR-FRET immunoassay was done in the Biochemistry and Biophysics Platform of the Bordeaux Neurocampus at the Bordeaux University funded by the LABEX BRAIN (ANR-10-LABX-43) with the help of Y. Rufin. The samples were obtained from the Brain Bank GIE NeuroCEB (BRIF number 0033-00011), funded by the patients' associations France Alzheimer, France Parkinson, ARSEP, and “Connaître les Syndromes Cérébelleux” to which we express our gratitude.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.V., J.O., P.D., B.D. and E.B. conceived and designed the study. M.B., S.C., M.T., G.P., I.T.D., C.E., N.G.C., M.T.H., B.D. and E.B. performed surgeries. S.D., M.L.A., A.P. and P.A. performed histologic and immunohistochemical analysis of the data. S.D., A.P. and M.L.A. performed imaging experiments. M.L.A. and M.L.T. performed biochemistry experiments. N.K. and B.M. performed biological fluids analysis. M.L.A., S.D., A.P., M.B., S.C., N.K., B.M., N.N.V., O.E.A., M.T.H., M.V., J.O., P.D., B.D. and E.B. analyzed the data. M.L.A., M.B., M.V., J.O., P.D., B.D. and E.B. wrote the paper. All authors discussed the results, assisted in the preparation and contributed to the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS STATEMENT

EB is a director and a shareholder of Motac Holdings Ltd. Other authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Edwards, L.L., Quigley, E.M. & Pfeiffer, R.F. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology* **42**, 726-732 (1992).
2. Knudsen, K., *et al.* Objective Colonic Dysfunction is Far more Prevalent than Subjective Constipation in Parkinson's Disease: A Colon Transit and Volume Study. *J Parkinsons Dis* **7**, 359-367 (2017).
3. Beach, T.G., *et al.* Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* **119**, 689-702 (2010).
4. Braak, H., *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **24**, 197-211 (2003).
5. Braak, H., de Vos, R.A., Bohl, J. & Del Tredici, K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* **396**, 67-72 (2006).
6. Ulusoy, A., *et al.* Caudo-rostral brain spreading of alpha-synuclein through vagal connections. *EMBO Mol Med* **5**, 1119-1127 (2013).
7. Ulusoy, A., *et al.* Brain-to-stomach transfer of alpha-synuclein via vagal preganglionic projections. *Acta Neuropathol* **133**, 381-393 (2017).
8. Manfredsson, F.P., *et al.* Induction of alpha-synuclein pathology in the enteric nervous system of the rat and non-human primate results in gastrointestinal dysmotility and transient CNS pathology. *Neurobiol Dis* **112**, 106-118 (2018).
9. Uemura, N., *et al.* Inoculation of alpha-synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. *Mol Neurodegener* **13**, 21 (2018).
10. Holmqvist, S., *et al.* Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol* **128**, 805-820 (2014).
11. Lionnet, A., *et al.* Does Parkinson's disease start in the gut? *Acta Neuropathol* **135**, 1-12 (2018).
12. Bourdenx, M., *et al.* Machine learning reveals pathological signatures induced by patient-derived alpha-synuclein structures. *Submitted* (2019).
13. Recasens, A., *et al.* Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol* **75**, 351-362 (2014).
14. Bezard, E., *et al.* Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**, 6853-6861 (2001).
15. Vaikath, N.N., *et al.* Generation and characterization of novel conformation-specific monoclonal antibodies for alpha-synuclein pathology. *Neurobiol Dis* **79**, 81-99 (2015).
16. Hinkle, J.T., *et al.* Dopamine transporter availability reflects gastrointestinal dysautonomia in early Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* **55**, 8-14 (2018).
17. Borghammer, P. Is constipation in Parkinson's disease caused by gut or brain pathology? *Parkinsonism Relat Disord* **55**, 6-7 (2018).
18. El-Agnaf, O.M., *et al.* Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* **17**, 1945-1947 (2003).

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Injection of Lewy bodies (LB) from Parkinson's disease patients into the striatum (Str) or the enteric nervous system (Gut) induces nigrostriatal neurodegeneration and synucleinopathy in the brain of baboon monkeys 2 years after administration. (A) Tyrosine hydroxylase (TH) staining at striatum and substantia nigra pars compacta (SNpc) levels. A green fire blue LUT (lookup table) was used to enhance contrast and highlight the difference between non-injected (n=5), LB-injected baboon monkeys either into the striatum (n=4) or in the gut (n=5). Scale bars = 5mm (striatum) and 10 μ m (SNpc). **(B)** Scatter plot of TH immunostaining in SNpc. $F_{(2,11)}=13.42$, $p=0.0011$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.0014$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.0060$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.5320$. **(C, D)** Scatter plots of mean grey values of striatal TH immunoreactivity in the putamen ($F_{(2,11)}=6.571$, $p=0.0133$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.0104$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.1809$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.2103$) **(C)** and in the caudate nucleus ($F_{(2,11)}=13.26$, $p=0.0012$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.0013$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.0087$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.3829$) **(D)** in non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. The horizontal line indicates the average value per group \pm standard error of the mean. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison. * $p < 0.05$ compared to non-injected animals. **(E)** Heat map representing the surface threshold of α -synuclein and S129 phosphorylated α -synuclein immunostaining intensity in the brain of non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. The heat maps show all brain regions measured and are organized according to cortical, basal ganglia and sub-cortical-related structures classification. From top to bottom: cingulate cortex (*ctx.cg*), sensorimotor cortex (*ctx.sm*), retro-insular cortex (*ctx.retins*), parahippocampal cortex (*ctx.phipp*), entorhinal cortex (*ctx.ent*), hippocampus (*hipp*), caudate nucleus (*cd*), putamen (*put*), substantia nigra (*sn*), ventral tegmental area (*vta*), red nucleus (*rn*), subthalamic nucleus (*stn*), lateral dorsal nucleus (*ldn*), lateral geniculate nucleus (*cgen*), claustrum (*cltm*), fornix (*frx*), white matter (*wm*), corpus callosum (*corcal*). The color bars represent the log2 value of the ratio of each brain regions. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison. * $p < 0.05$ compared to non-injected animals.

Fig. 2. Injection of LB into the striatum (Str) or in the enteric nervous system (Gut) induces enteric synucleinopathy in baboon monkeys. (A) Representative confocal microscopy images of Neuron Specific Enolase (NSE) and α -synuclein immunostaining in the myenteric plexus from the duodenum of non-injected, LB-injected baboon monkeys either into the striatum or in the gut. Scale bar = 25 μ m. (B) Scatter plot of mean α -synuclein immunostaining in NSE-positive cells of the duodenum. $F_{(2,11)}=10.07$, $p=0.0033$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.0060$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.0082$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.9150$. The horizontal line indicates the average value per group \pm standard error of the mean. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison. * $p < 0.05$ compared to non-injected animals. (C) Linear regression between mean grey value of TH immunostaining in the putamen and the mean α -synuclein immunostaining in NSE-positive cells of the duodenum for non-injected, LB-injected baboon monkeys either into the striatum or in the gut. $F_{(1,12)}=9.703$, $p=0.0089$, $r^2=0.4471$. Each dot represents one monkey of the non-injected (black), LB-injected baboon monkeys either into the striatum (blue) or in the gut (green). (D) Linear regression between mean grey value of TH immunostaining in the SNpc and the mean α -synuclein immunostaining in NSE-positive cells of the duodenum for non-injected, LB-injected baboon monkeys either into the striatum or in the gut. $F_{(1,12)}=11.85$, $p=0.0049$, $r^2=0.4969$. Each dot represents one monkey of the non-injected (black), LB-injected baboon monkeys either into the striatum (blue) or in the gut (green). Spearman r and p values are displayed on the graph.

Supplementary Fig. 1. LB injection into the striatum (Str) or in the enteric nervous system (Gut) induces mild-to-moderate loss of dopaminergic neurons in the brain of baboon monkeys. (A) Scatter-plot of TH-positive SNpc neurons by stereology. $F_{(2,11)}=1.355$, $p=0.2977$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.5191$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.8588$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.2766$. (B) Scatter-plot of Nissl-positive cells in the SNpc counted by stereology. $F_{(2,11)}=2.274$, $p=0.1491$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.3573$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.1423$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.8664$. The horizontal line indicates the average value per group \pm standard error of the mean. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison.

Supplementary Fig. 2. Inflammatory reaction in the brain of LB-injected baboon monkeys. (A) Representative images (top) and quantification (bottom) of GFAP-positive astrocytic immunostaining expressed in percentage of control group in the putamen

($F_{(2,11)}=2.063$, $p=0.1734$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.7290$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.1532$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.5128$); in the entorhinal cortex ($F_{(2,11)}=1.077$, $p=0.3809$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.6248$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.3767$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.9421$) and in the white matter ($F_{(2,11)}=4.602$, $p=0.0353$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.0374$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.1116$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.7234$) in non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. **(B)** Representative images (top) and quantification (bottom) of Iba1-positive microglial cells immunostaining expressed in percentage of control group in the putamen ($F_{(2,11)}=0.4133$, $p=0.6713$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.6748$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.7885$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.9701$); in the entorhinal cortex ($F_{(2,10)}=9.200$, $p=0.054$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.0041$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.2655$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.0423$) and in the white matter ($F_{(2,11)}=0.4984$, $p=0.6206$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.7167$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.6449$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.9974$) in non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. The horizontal line indicates the average value per group \pm standard error of the mean. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison. * $p < 0.05$ compared to non-injected animals and # $p < 0.05$ compared to LB-injected (Gut) animals. Scale bar = 40 μ m.

Supplementary Fig. 3. LB injection into the striatum (Str) or in the enteric nervous system (Gut) induces mild-to-moderate specific pattern of α -synuclein levels in the brain of baboon monkeys. **(A)** Representative coronal brain sections of endogenous α -synuclein immunostaining (left) and illustrative photomicrographs of endogenous α -synuclein in the putamen (blue square), in the SNpc (green square), in the entorhinal cortex (pink square) and in the para-hippocampal cortex (purple square) in non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. Scale bars = 5mm (left, section) and 40 μ m (right, inset). **(B)** Scatter plots of α -synuclein immunostaining expressed in percentage of control group in the caudate nucleus ($F_{(2,11)}=1.122$, $p=0.3601$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.3990$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.9979$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.4285$.); in the posterior putamen ($F_{(2,11)}=5.677$, $p=0.0202$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.0350$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.0374$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.9775$.); in the substantia nigra ($F_{(2,11)}=0.9029$, $p=0.4334$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.4171$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.9283$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.6123$.); in the cingulate cortex ($F_{(2,11)}=1.296$, $p=0.3123$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.2941$. Control vs

LB-injected (Gut): $p=0.5832$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.8104$.); in the para-hippocampal cortex ($F_{(2,11)}=4.817$, $p=0.0314$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.0251$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.3055$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.2714$.) and in the entorhinal cortex ($F_{(2,11)}=2.023$, $p=0.1786$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.1594$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.7594$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.4137$) in non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. The horizontal line indicates the average value per group \pm standard error of the mean. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison. * $p < 0.05$ compared to non-injected animals.

Supplementary Fig. 4. LB injection into the striatum (Str) or in the enteric nervous system (Gut) induces mild-to-moderate specific pattern of S129 phosphorylated α -synuclein levels in the brain of baboon monkeys. (A) Representative coronal brain sections of endogenous α -synuclein immunostaining (left) and illustrative photomicrographs of endogenous α -synuclein in the putamen (blue square), in the SNpc (green square), in the entorhinal cortex (pink square) and in the para-hippocampal cortex (purple square) in non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. Scale bars = 5mm (left, section) and 40 μ m (right, inset). (B) Scatter plots of S129 phosphorylated α -synuclein immunostaining expressed in percentage of control group in the caudate nucleus ($F_{(2,11)}=0.8311$, $p=0.4612$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.4681$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.9786$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.5743$.); in the posterior putamen ($F_{(2,11)}=0.8710$, $p=0.4455$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.8379$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.7223$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.4206$.); in the substantia nigra ($F_{(2,11)}=4.808$, $p=0.0316$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.0396$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.9699$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.0578$.); in the cingulate cortex ($F_{(2,11)}=0.8468$, $p=0.4549$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.4918$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.9981$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.5226$.); in the para-hippocampal cortex ($F_{(2,11)}=8.968$, $p=0.0049$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.0038$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.2555$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.0558$.) and in the entorhinal cortex ($F_{(2,11)}=2.526$, $p=0.1251$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.1067$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.5358$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.4698$.) in non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. The horizontal line indicates the average value per group \pm standard error of the mean. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison. * $p < 0.05$ compared to non-injected animals.

Supplementary Fig. 5. TR-FRET quantification of aggregated α -synuclein in striatal samples and ENS samples. (A) Quantification of aggregated α -synuclein content in the posterior putamen ($F_{(2,11)}=2.566$, $p=0.1217$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.3750$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.1095$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.7655$), the anterior putamen ($F_{(2,11)}=0.3858$, $p=0.6888$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.8011$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.6919$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.9888$) and the caudate nucleus ($F_{(2,11)}=3.958$, $p=0.0507$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.0439$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.6427$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.1804$) of non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. (B) Quantification of aggregated α -synuclein content in the myenteric plexus of the antrum ($F_{(2,9)}=12.69$, $p=0.0024$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.0095$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.0022$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.6403$), the mucosal/submucosal plexus of the antrum ($F_{(2,9)}=1.395$, $p=0.2968$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.2839$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.4438$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.8881$), in the myenteric plexus of the fundus ($F_{(2,9)}=24.91$, $p=0.0002$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.0127$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.0002$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.0177$) and the the mucosal/submucosal plexus of the fundus ($F_{(2,7)}=4.209$, $p=0.0631$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.1688$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.0586$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.6192$) of non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison. * $p < 0.05$ compared to non-injected animals and # $p < 0.05$ compared to LB-injected (Str) animals.

Supplementary Fig. 6. Injection of LB into the striatum or in the enteric nervous system (Gut) results in specific pattern of oligomeric forms of α -synuclein in the brainstem. (A) Representative images (top) and quantification (bottom) of oligomeric form of α -synuclein immunoblotting by dot-blot assay using Syn-O1 antibody in the substantia nigra (Cohen's $d = -0.88$), the anterior putamen (Cohen's $d = -0.92$), the posterior putamen (Cohen's $d = -0.68$) and the caudate (Cohen's $d = -1.42$) of non-injected and LB-injected (Gut) baboon monkeys. Quantification are expressed in percentage of control group. Comparison were made using a Cohen's d effect size analysis ($CL = 0.95$, $z_{\alpha/2}=1.96$). (B) Representative images (top) and quantification (bottom) of oligomeric form of α -synuclein immunoblotting by dot-blot assay using Syn-O1 antibody in the substantia nigra (Cohen's $d = 0.18$), the anterior putamen (Cohen's $d = -1.47$), the posterior putamen (Cohen's $d = 0.98$) and the caudate (Cohen's $d = -$

1.62) of non-injected and LB-injected (Gut) baboon monkeys. Quantification are expressed in percentage of control group. Comparison were made using a Cohen's d effect size analysis (CL = 0.95, $z_{\alpha/2}=1.96$).

Supplementary Fig. 7. Distribution of α -synuclein in the duodenum in non-injected animals. (A) Representative confocal microscopy images of the neuronal marker (NF200), α -synuclein (Syn-1) and the enteric glial marker (Sox10) immunostaining in the duodenum of non-injected, LB-injected baboon monkeys either into the striatum or in the gut. (B) Representative confocal microscopy images of the neuronal marker (NSE), α -synuclein (Syn-1) and the enteric glial marker (Sox10) immunostaining in the duodenum of non-injected baboon monkeys. Scale bar = 25 μ m.

Supplementary Fig. 8. Initiation of the α -synuclein pathology in the enteric nervous system of baboon monkeys after LB injection into the striatum (Str) and in the enteric nervous system (Gut). (A) Representative images (top) and quantification (bottom) of : (Left) total α -synuclein immunoblotting by dot-blot assay using nitrocellulose membrane and Syn-1 antibody in the mucosal/submucosal plexus ($F_{(2,9)}=17,72$, $p=0.0008$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.0007$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.0027$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.4038$) and the myenteric plexus ($F_{(2,9)}=1.295$, $p=0.3204$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.5090$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.2986$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.9083$) of the antrum tissue of LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys; (Right) oligomeric form of α -synuclein immunoblotting by dot-blot assay using nitrocellulose membrane and Syn-O1 antibody in the mucosal/submucosal plexus ($F_{(2,9)}=1.124$, $p=0.3667$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.9432$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.3960$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.5277$) and the myenteric plexus ($F_{(2,9)}=0.0840$, $p=0.9201$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.9409$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.9201$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.9989$) of the antrum tissue of LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys ; (B) Representative images (top) and quantification (bottom) of : (Left) total α -synuclein immunoblotting by dot-blot assay using Syn-1 antibody in the mucosal/submucosal plexus ($F_{(2,7)}=1.278$, $p=0.3364$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.4112$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.3733$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.9820$) and the myenteric plexus ($F_{(2,9)}=1.194$, $p=0.3467$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.3322$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.4979$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.8990$) of the fundus tissue of LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys ;

(Right) oligomeric form of α -synuclein immunoblotting by dot-blot assay using Syn-O1 antibody in the mucosal/submucosal plexus (($F_{(2,7)}=0.2114$, $p=0.8144$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.9754$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.9144$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.8003$) and the myenteric plexus (($F_{(2,9)}=0.4694$, $p=0.6399$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.9117$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.6248$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.8417$) of the Fundus tissue of of LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison. * $p < 0.05$ compared to non-injected animals.

Supplementary Fig. 9. Routes of propagation of α -synuclein between the central nervous system and the enteric nervous system. (A) Representative images of S129 phosphorylated α -synuclein immunostaining into the fibers (top) and the cells (bottom) of the vagal nerve in non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. Scale bar = 40 μ m (B, C) Scatter plot of S129 phosphorylated α -synuclein immunostaining (B) in the vagal fibers ($F_{(2,11)}=1.545$, $p=0.2562$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.8445$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.2367$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.5474$) and (C) in the vagal cells ($F_{(2,11)}=0.6148$, $p=0.5583$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.9595$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.7000$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.5650$). The horizontal line indicates the average value per group \pm standard error of the mean. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison. * $p < 0.05$ compared to non-injected animals. (D, E) Linear regression between the mean α -synuclein immunostaining in NSE-positive cells of the duodenum and the surface occupied by the S129 phosphorylated α -synuclein immunostaining (D) in the vagal fibers ($F_{(1,12)}=0.9714$, $p=0.3438$, $r^2=0.0749$) and (E) in the vagal cells ($F_{(1,12)}=0.7163$, $p=0.4139$, $r^2=0.0563$) for non-injected, LB-injected baboon monkeys either into the striatum or in the gut. Each dot represents one monkey of the non-injected (black), LB-injected baboon monkeys either into the striatum (blue) or in the gut (green). (F-I) Scatter plot of α -synuclein concentration (F) in the whole blood ($F_{(2,11)}=6.086$, $p=0.0166$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.0211$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.0476$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.8077$), (G) in the serum ($F_{(2,11)}=5.099$, $p=0.0271$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.0242$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.6610$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.0995$), (H) in the plasma ($F_{(2,11)}=2.521$, $p=0.1255$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.1179$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.3345$. LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.7198$), (I) in the cerebrospinal fluid ($F_{(2,11)}=1.092$, $p=0.3694$. Control vs LB-injected (Str): $p=0.9686$. Control vs LB-injected (Gut): $p=0.3745$. LB-injected

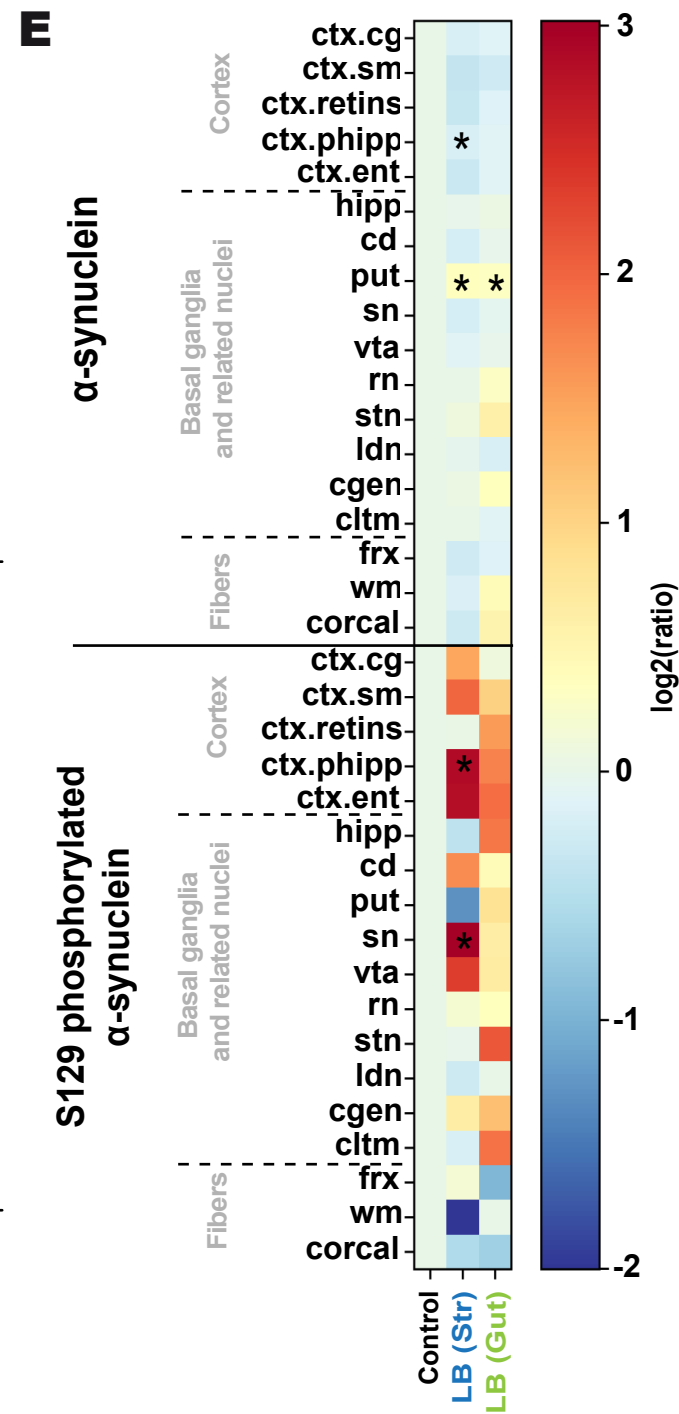
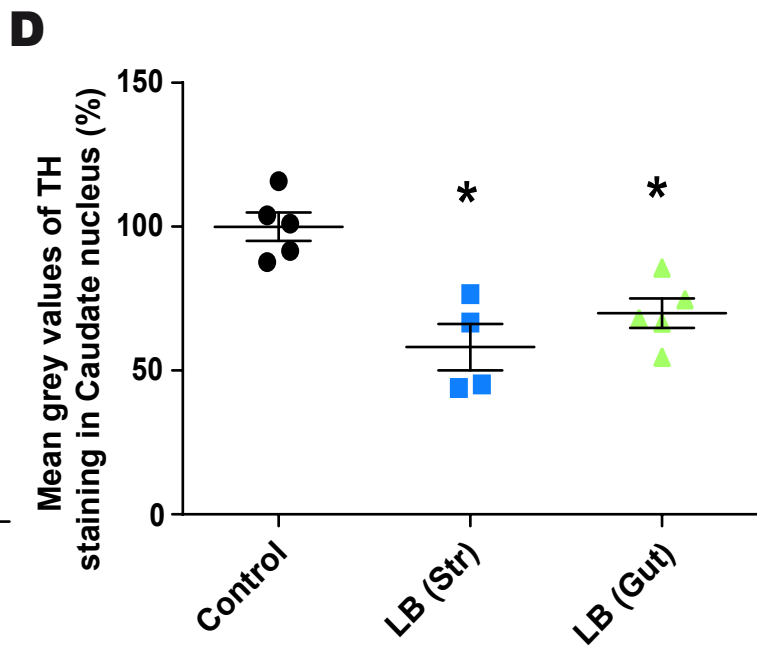
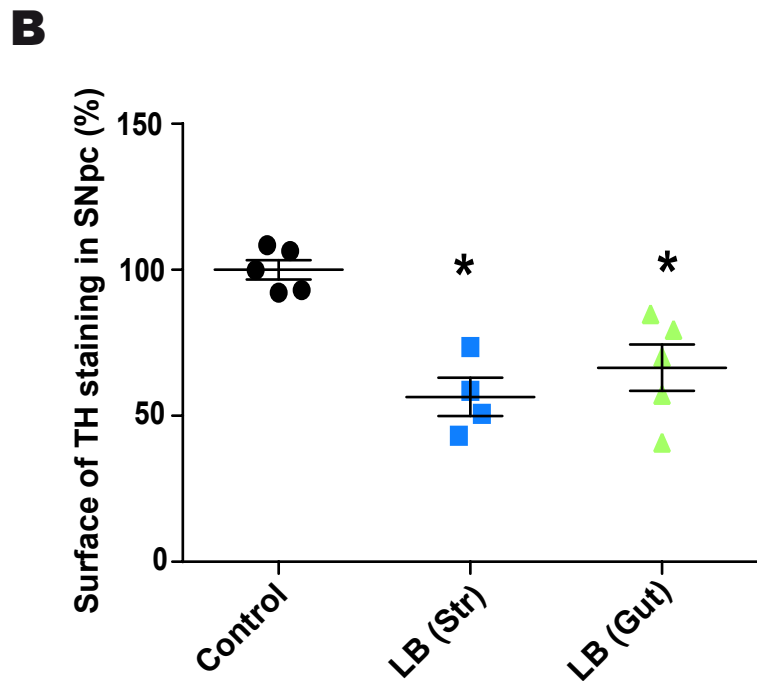
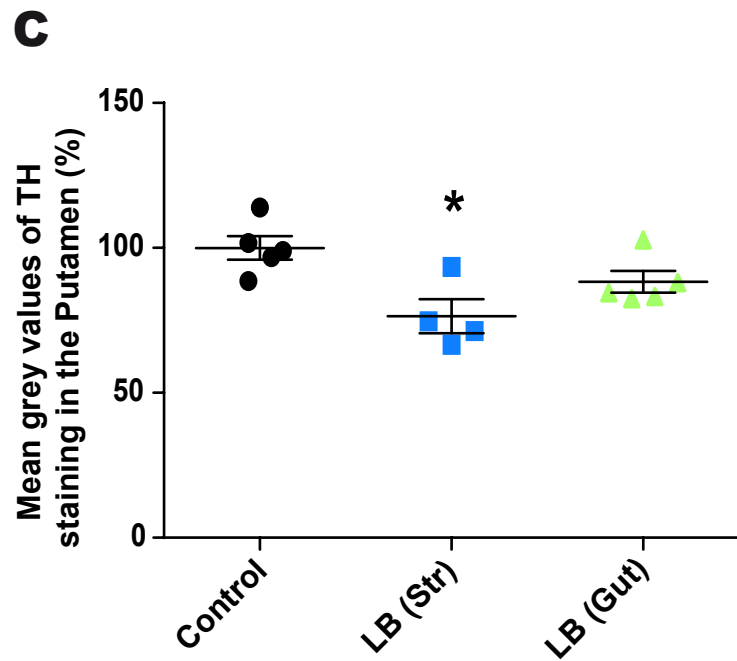
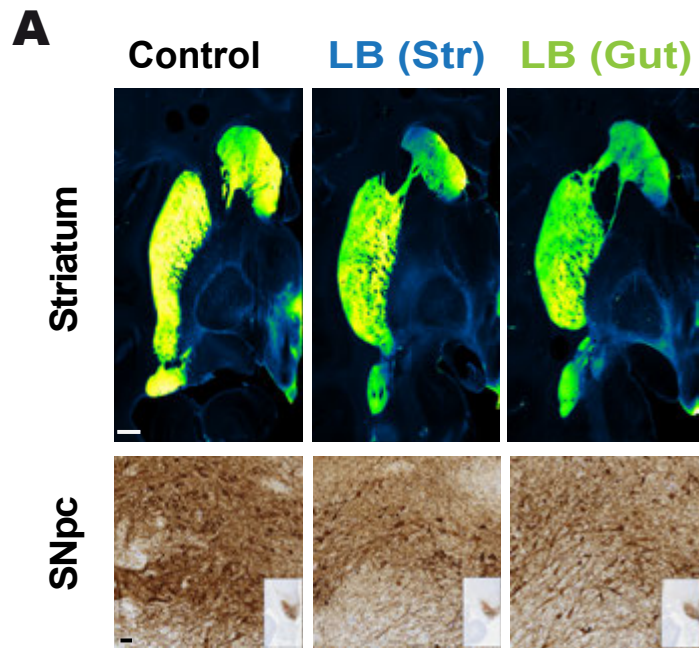
(Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.5461$). The horizontal line indicates the average value per group \pm standard error of the mean. Comparison were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparison. $*p < 0.05$ compared to non-injected animals. **(J, K)** Linear regression between the mean α -synuclein immunostaining in NSE-positive cells of the duodenum and the α -synuclein concentration **(J)** in the whole blood ($F_{(1,12)}=7.289$, $p=0.0193$, $r^2=0.3779$) and **(K)** in the plasma ($F_{(1,12)}=11.98$, $p=0.0047$, $r^2=0.4996$), for non-injected, LB-injected baboon monkeys either into the striatum or in the gut. Each dot represents one monkey of the non-injected (black), LB-injected baboon monkeys either into the striatum (blue) or in the gut (green). Spearman r and p values are displayed on the graph.

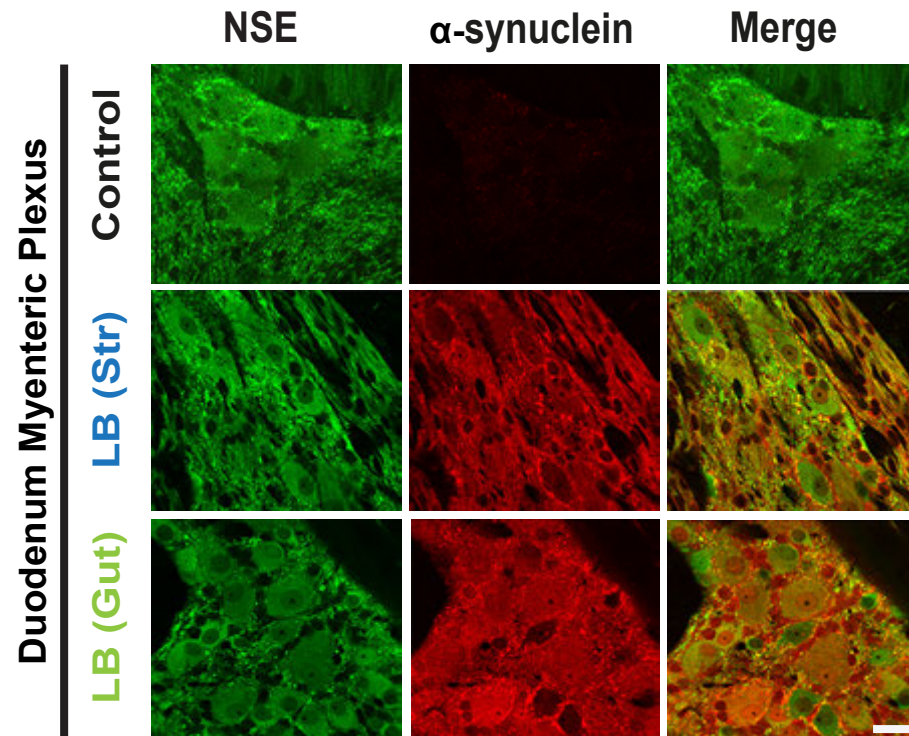
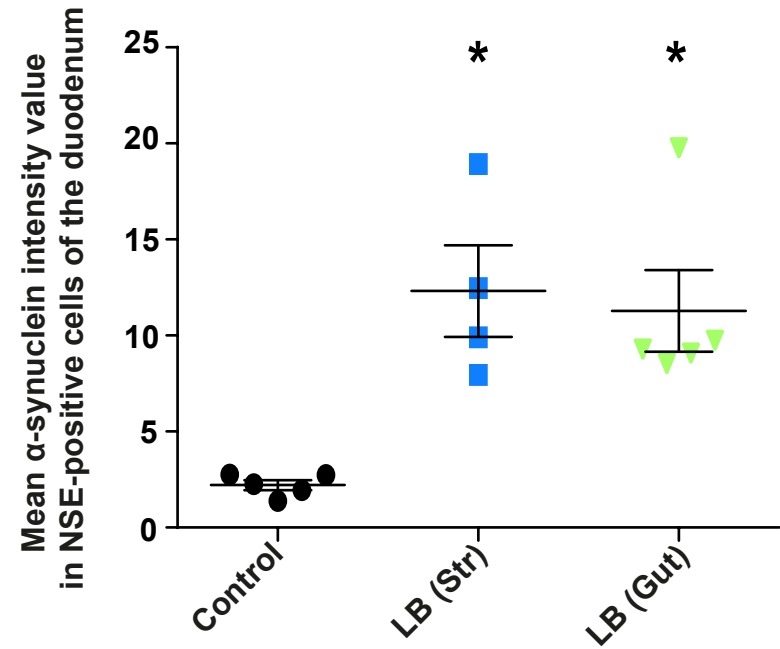
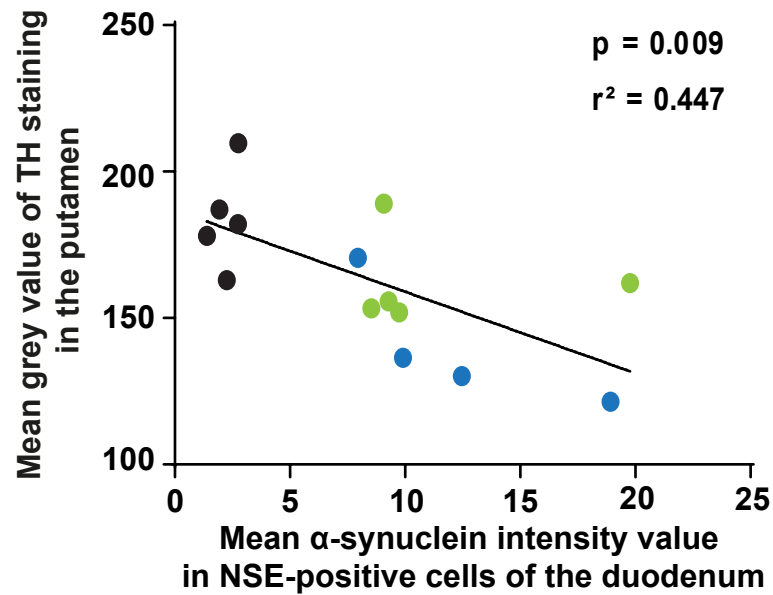
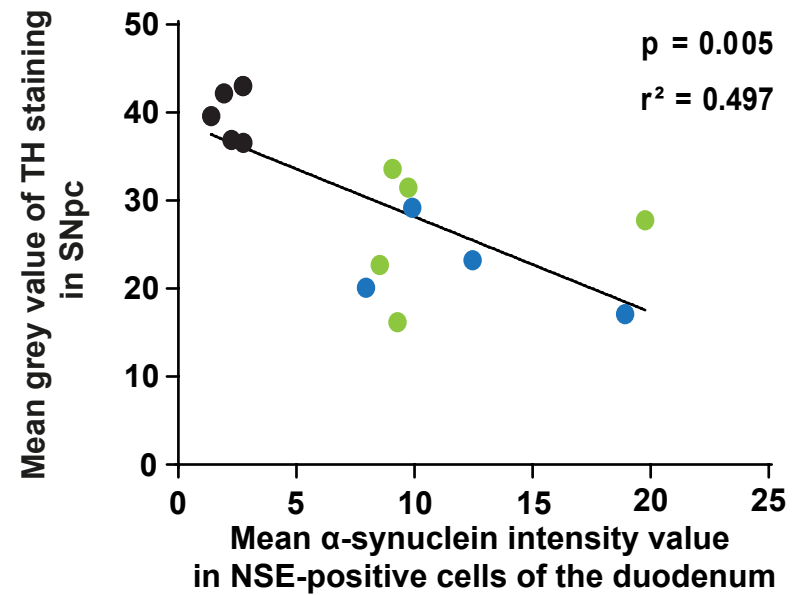
Supplementary Fig. 10. Lack of evidence of aggregated α -synuclein accumulation in the vagal nerve of LB-injected baboons. Representative images (left) and quantification (right) of: **(A)** total α -synuclein immunoblotting by filter retardation assay using Syn-1 antibody ($F_{(2,11)}=0.2072$, $p=0.8159$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.9525$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.9304$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.8016$) in vagal nerve extracts of non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys; **(B)** oligomeric forms of α -synuclein immunoblotting by dot-blot assay using Syn-O1 antibody ($F_{(2,11)}=0.7070$, $p=0.5142$; Control vs LB-injected (Str): $p=0.4856$; Control vs LB-injected (Gut): $p=0.7989$; LB-injected (Str) vs LB-injected (Gut): $p=0.8349$) in vagal nerve extracts of non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. **(C)** Representative images of the fibers (top) and the cells (bottom) of the vagal nerve immunostained with 5G4 antibody in non-injected, LB-injected (Str) and LB-injected (Gut) baboon monkeys. Scale bar = $20\mu\text{m}$.

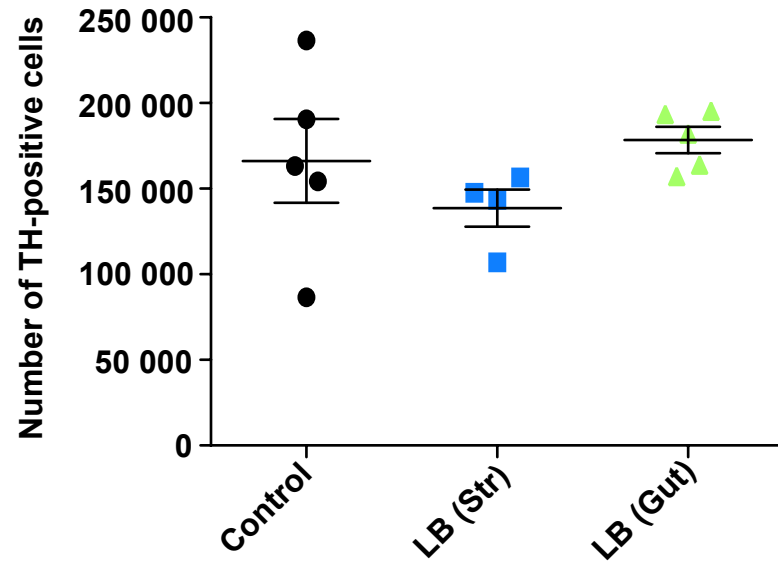
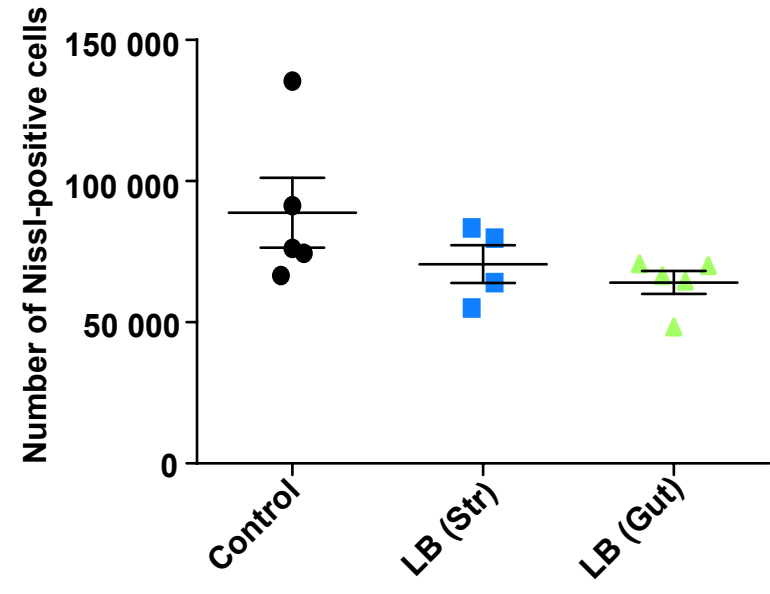
Supplementary Fig. 11. Injection of LB into the striatum (Str) or in the enteric nervous system (Gut) does not induce synucleinopathy in the dorsal motor nucleus of the vagus (dmnX) in baboon monkeys. **(A)** Illustration adapted from the baboon brain stereotaxic atlas of Davis R., Huffman R.D. depicting the dmnX in a cresyl-violet-stained brain section (left) and representative coronal brain section of choline acetyltransferase (ChAT), endogenous α -synuclein and S129 phosphorylated α -synuclein immunostaining (right) in the dmnX. Scale bar = 2mm . **(B)** Schematic (left) and representative images of immunohistochemical staining for choline acetyltransferase (ChAT), α -synuclein, S129 phosphorylated α -synuclein (right) in the dmnX, based on the stereotaxic atlas of the baboon brain of Davis R. and Huffman R.D. (1968). Scale bars = $40\mu\text{m}$.

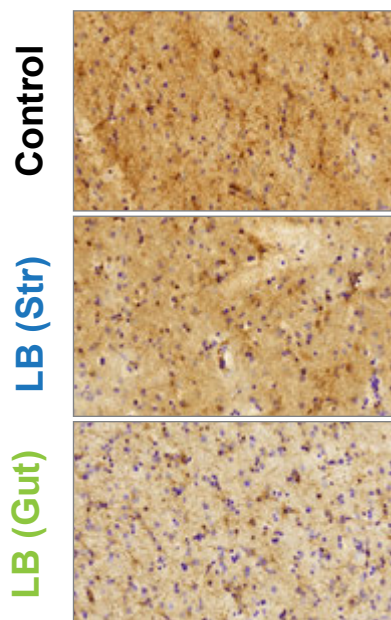
Supplementary Fig. 12. Schematic illustration of the bidirectional propagation of α -synuclein pathology between the CNS and the ENS. Injection of LB-enriched fractions from PD patients into the duodenum induced the initiation of the α -synuclein pathogenicity locally in the enteric nervous system before propagating anterogradely towards the central nervous system. Conversely, injection of LB-enriched fractions from PD patients into the striatum induced the initiation of the α -synuclein pathogenicity locally in the central nervous system before propagating retrogradely towards the enteric nervous system. Thus, the α -synuclein protein propagated in a bidirectional way between the CNS and the ENS before spreading in each nervous system through cell-to-cell transmission.

Supplementary Table 1. Raw data that served for the NHP study analyses for all histological and biochemical approaches.

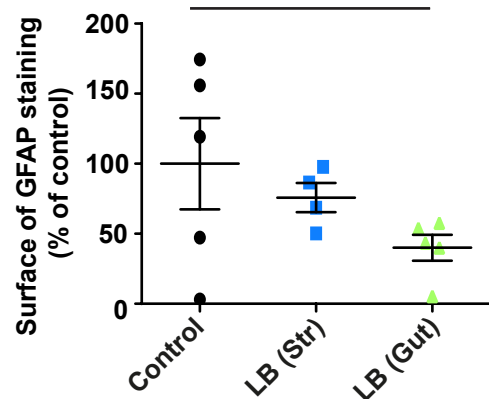
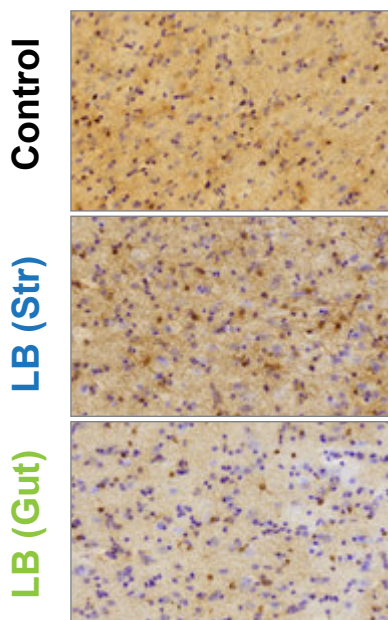


A**B****C****D**

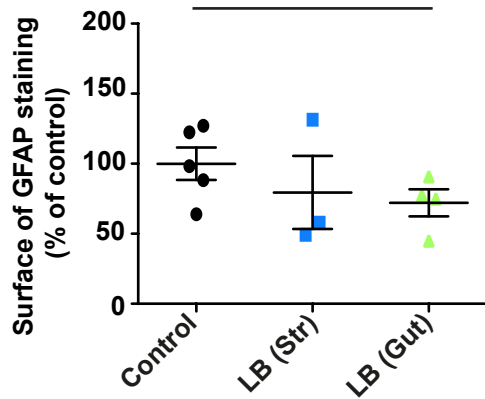
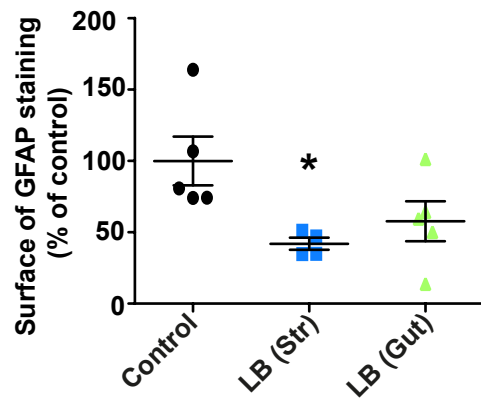
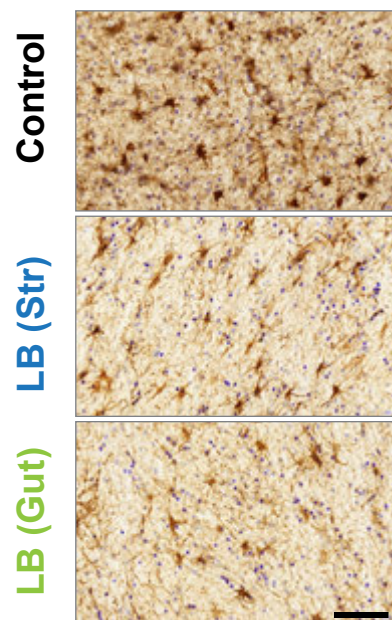
A**B**

A**Putamen**

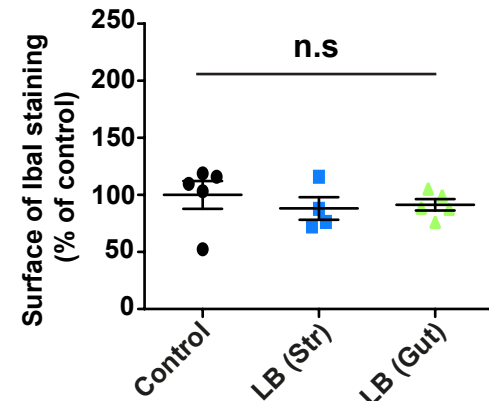
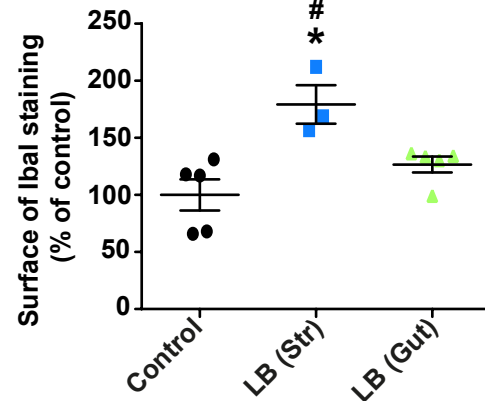
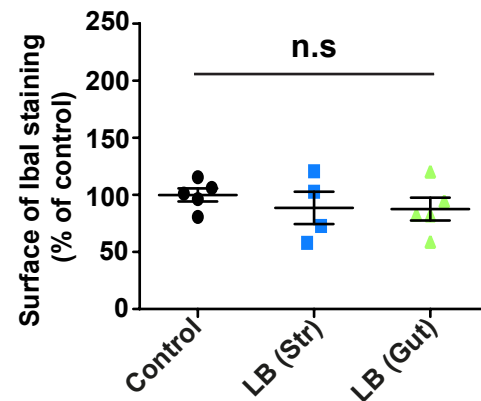
n.s

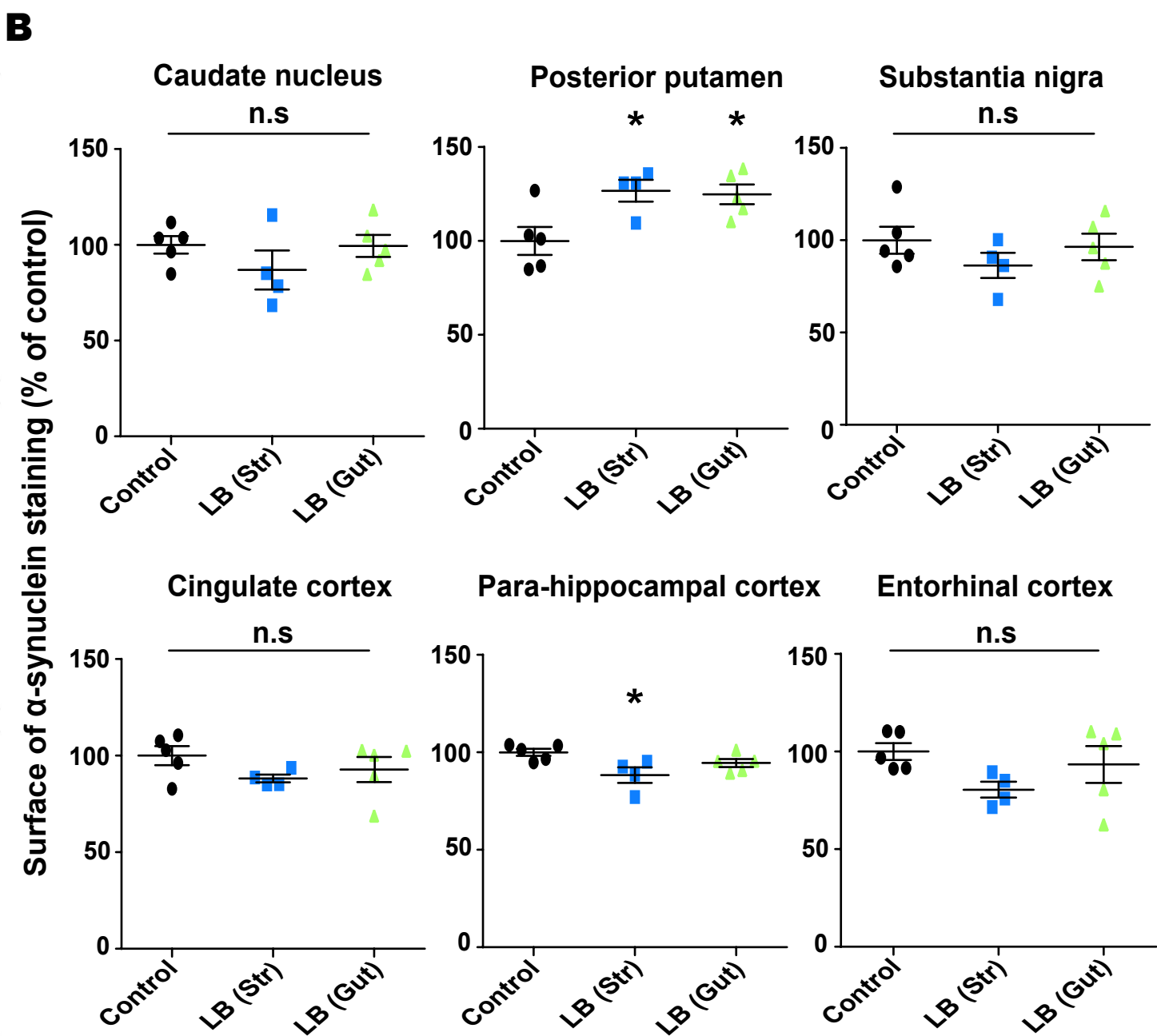
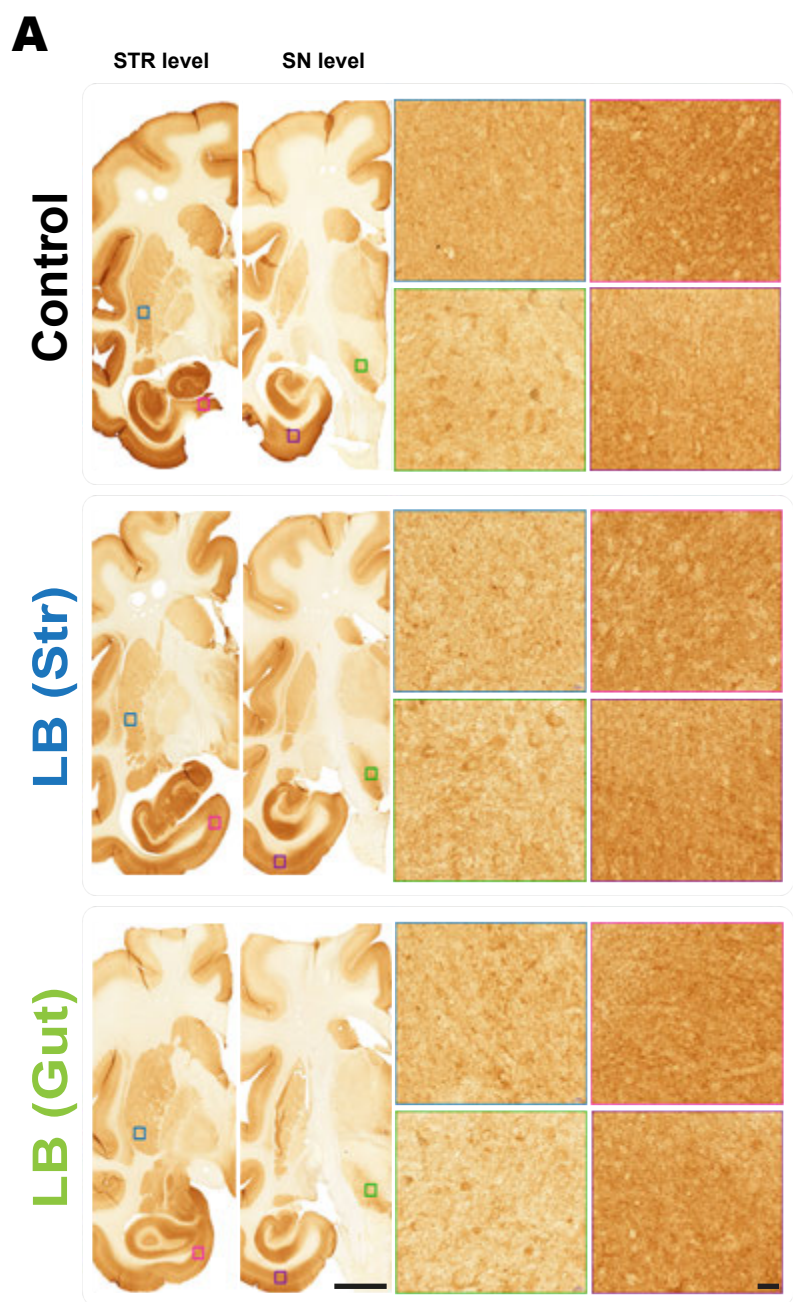
**Entorhinal cortex**

n.s

**White matter****B****Putamen**

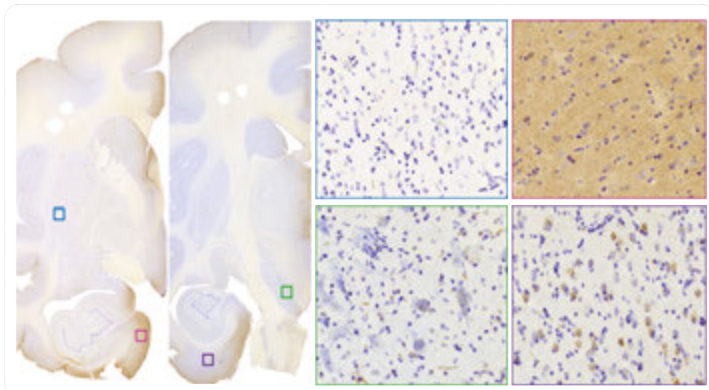
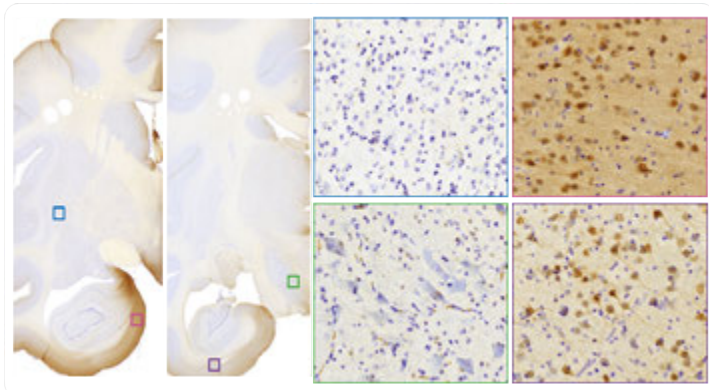
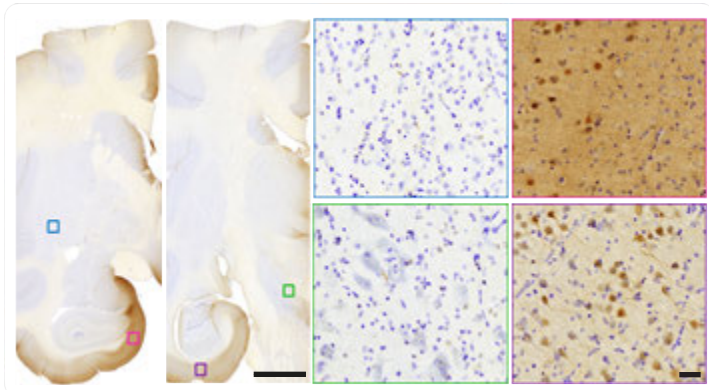
n.s

**Entorhinal cortex****White matter**

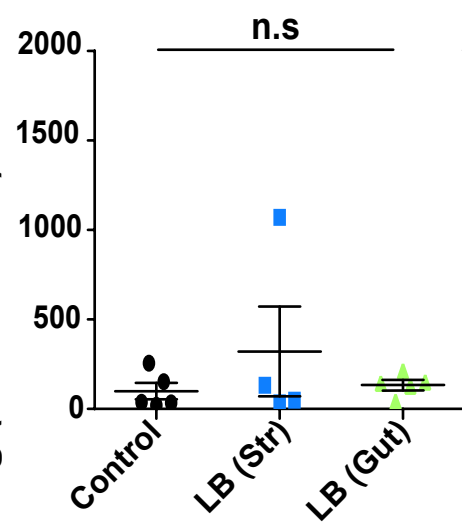


A

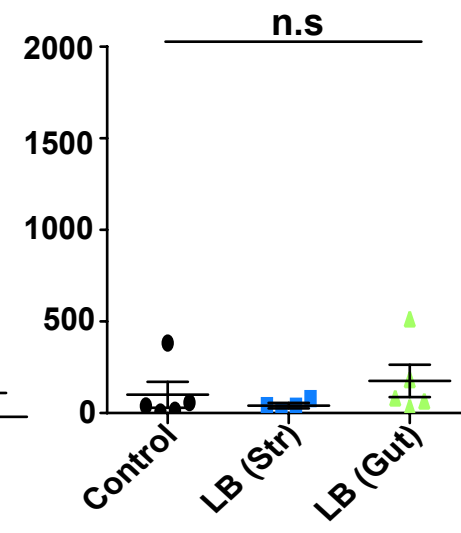
STR level SN level

Control**LB (Str)****LB (Gut)****B**Surface of S129 phosphorylated
 α -synuclein staining (% of control)

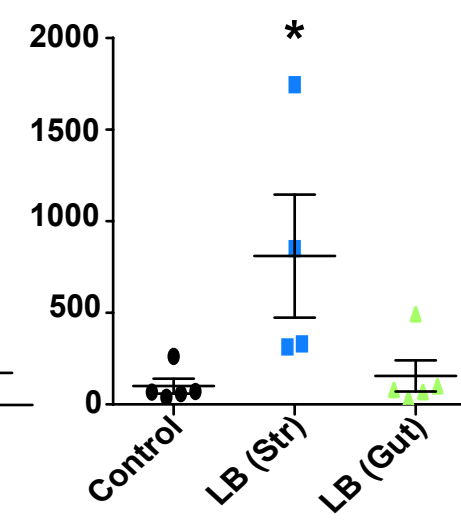
Caudate nucleus



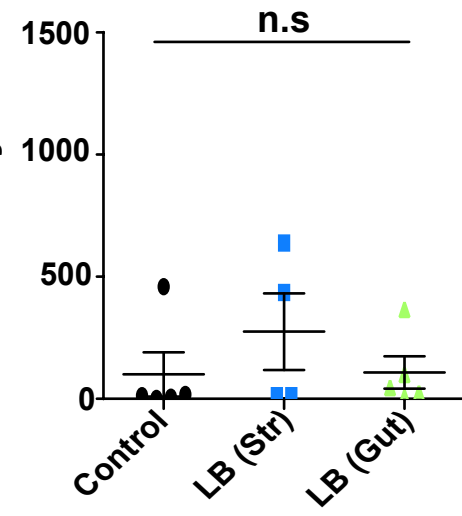
Posterior putamen



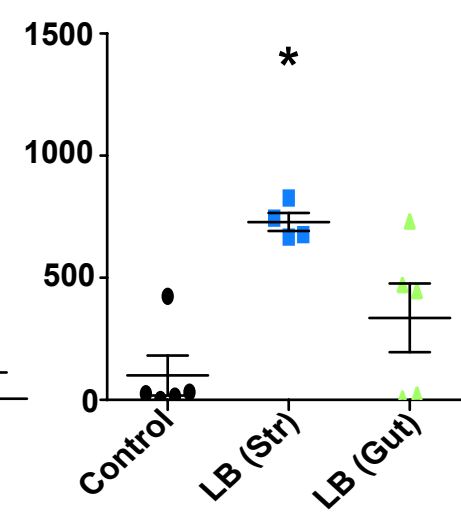
Substantia nigra



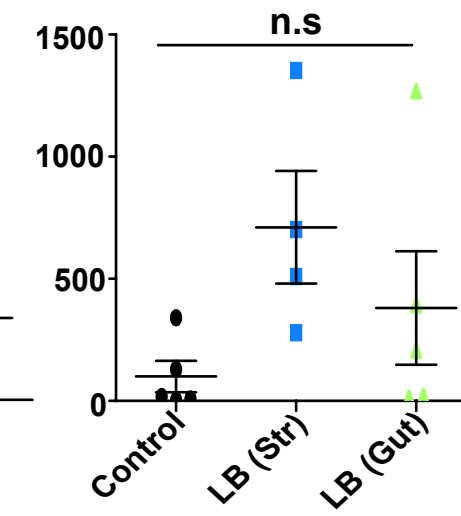
Cingulate cortex

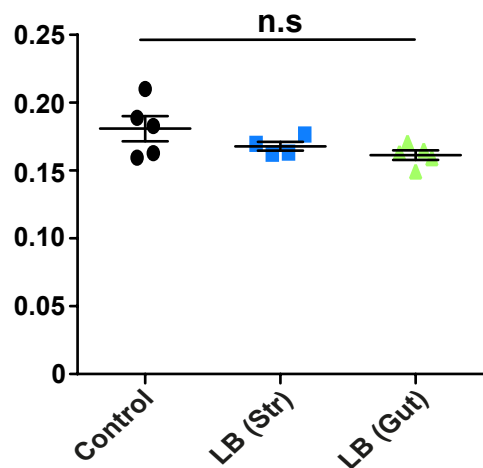
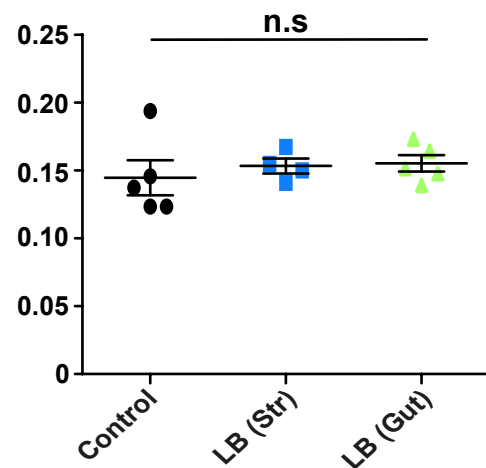
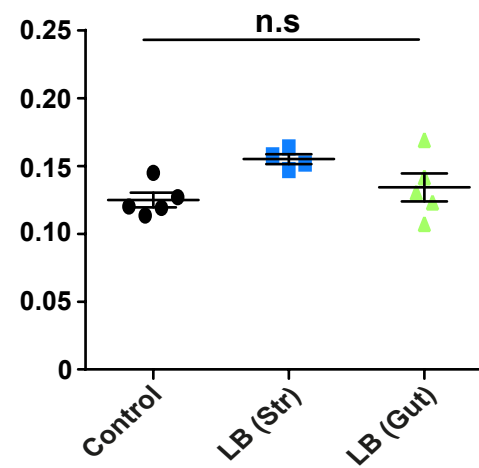
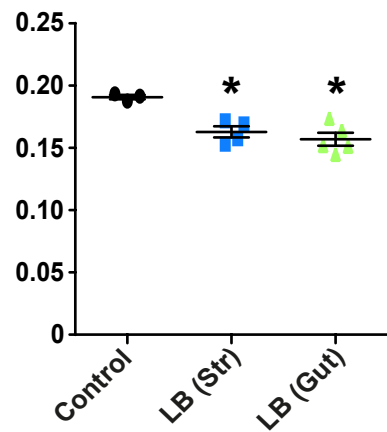
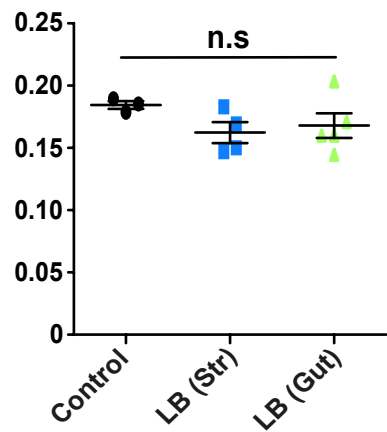
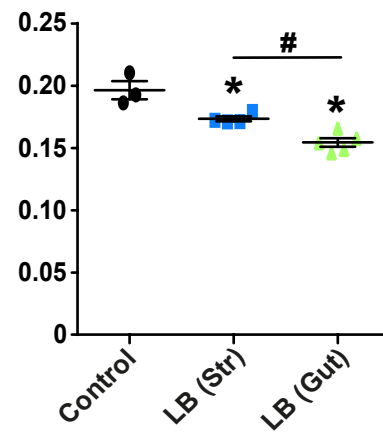
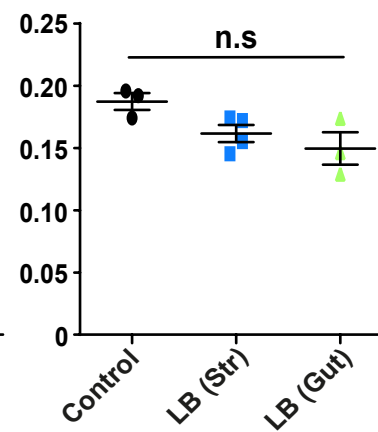


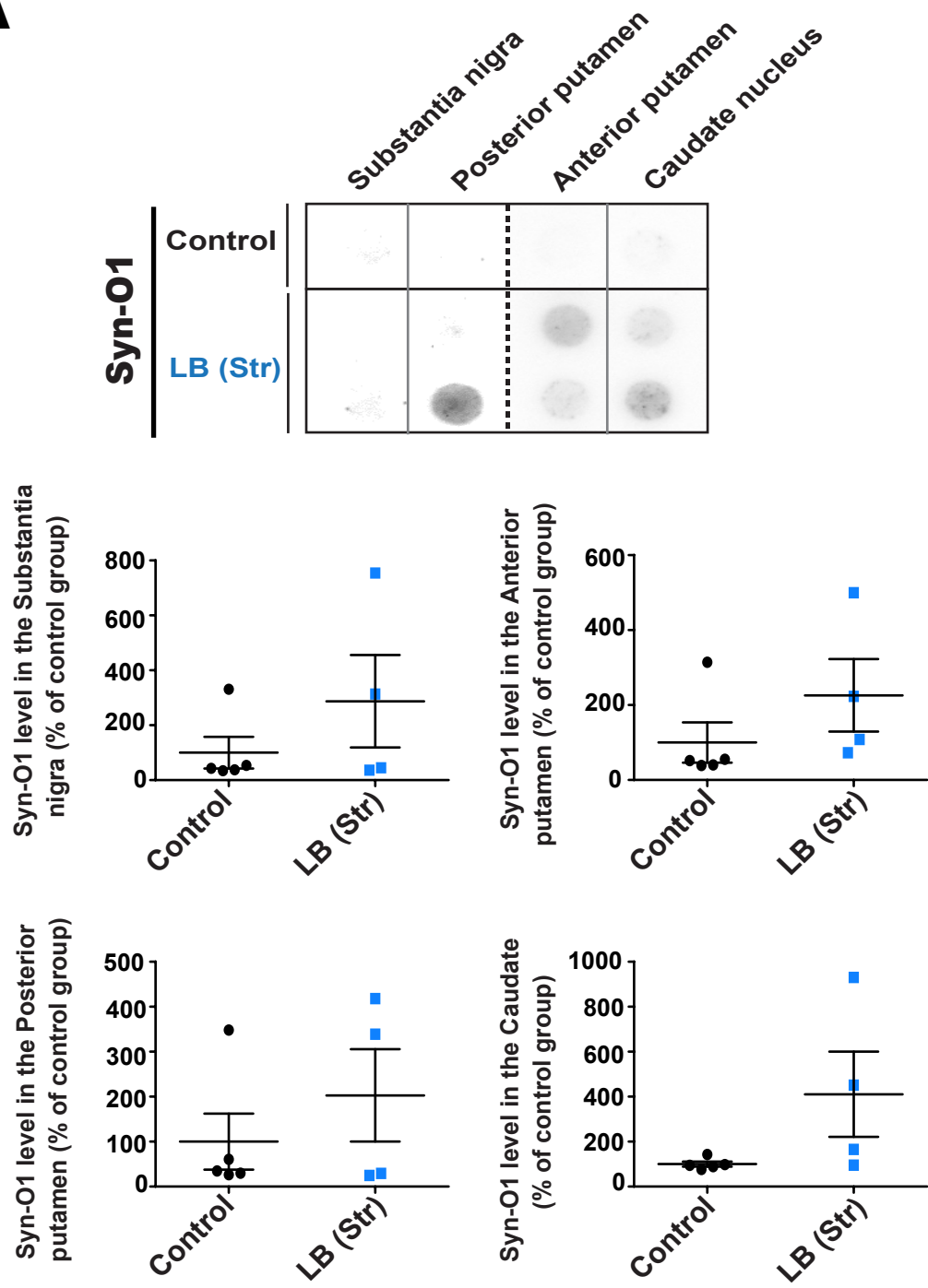
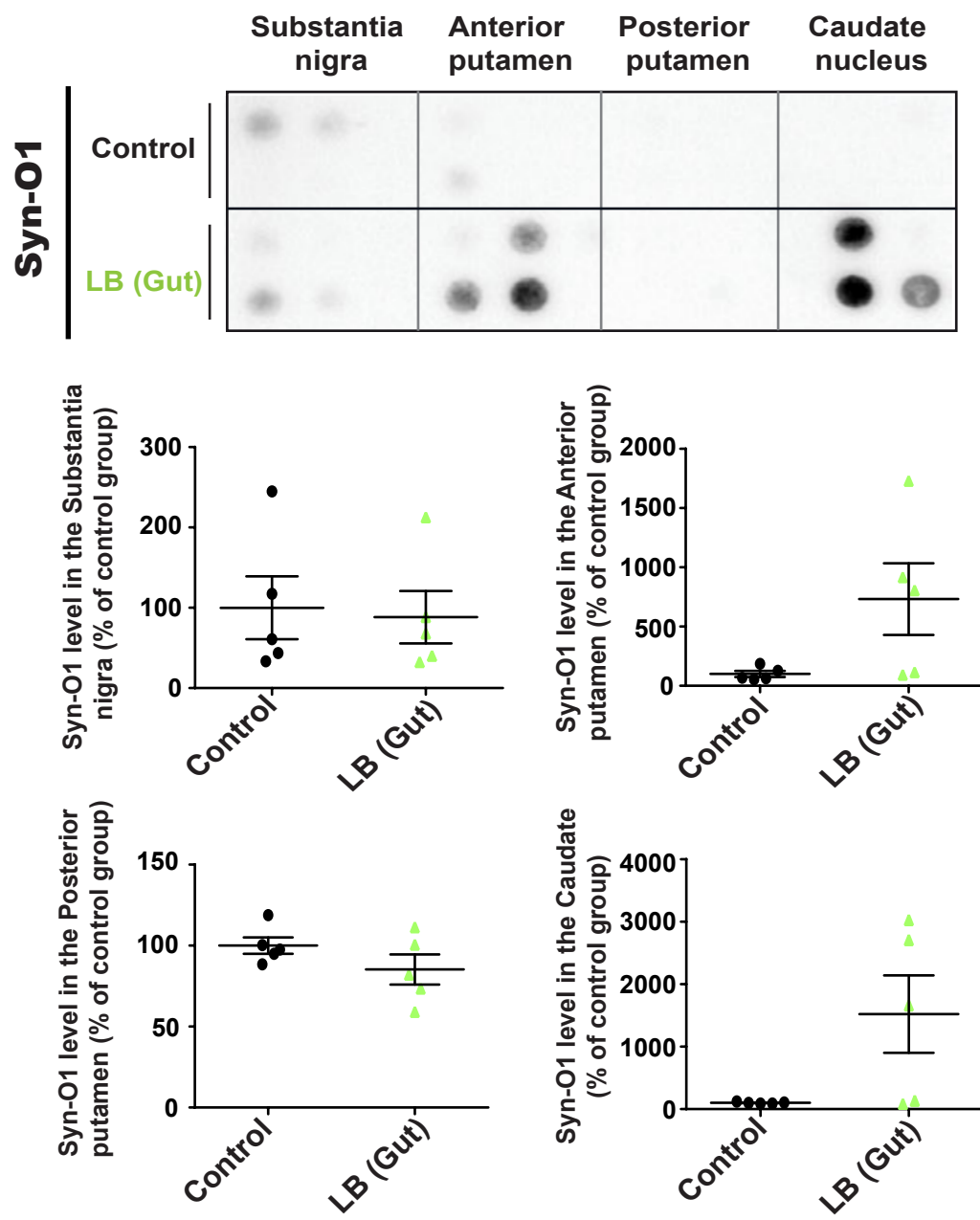
Para-hippocampal cortex

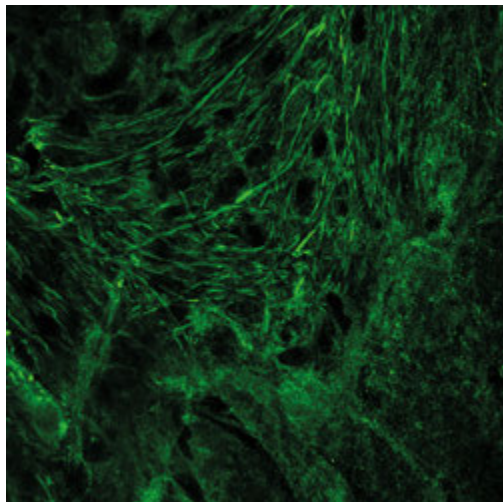
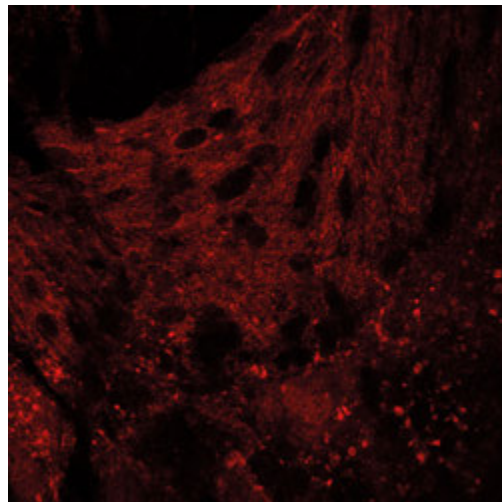
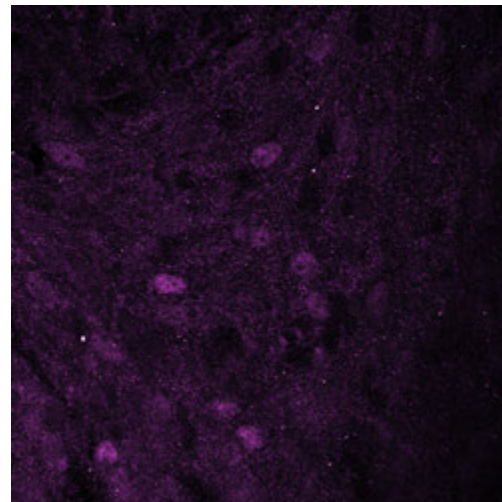
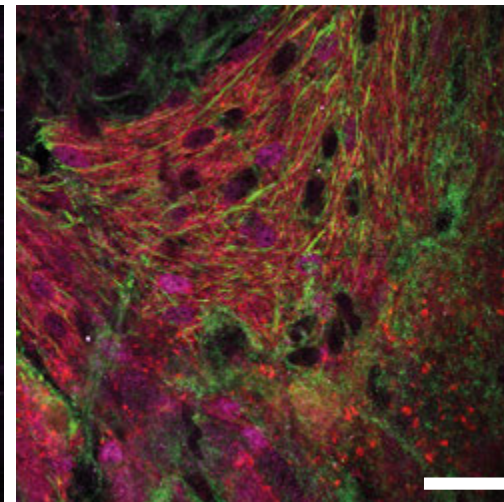
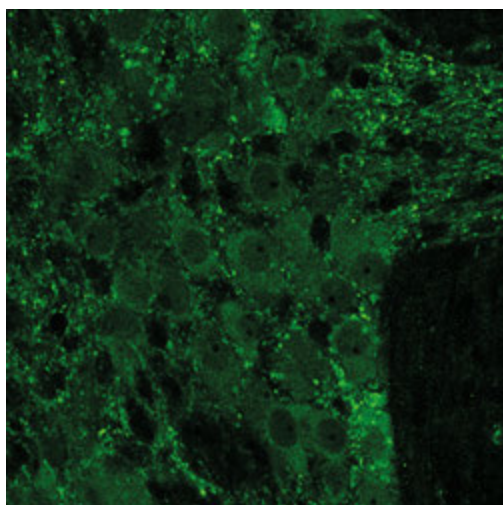
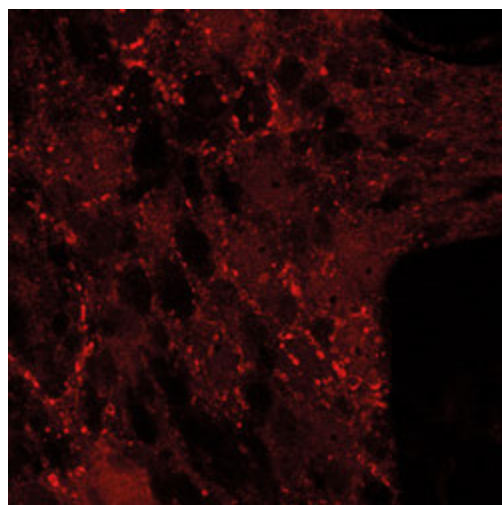
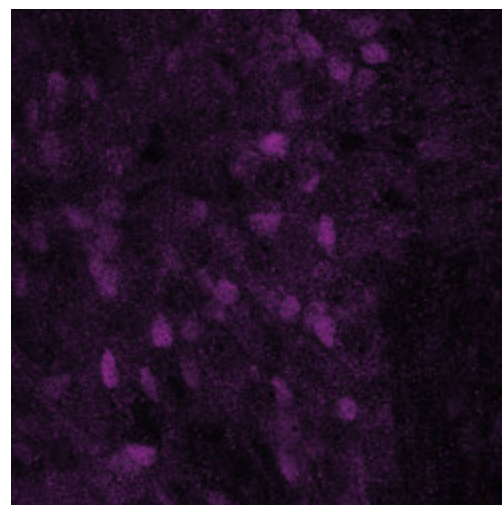
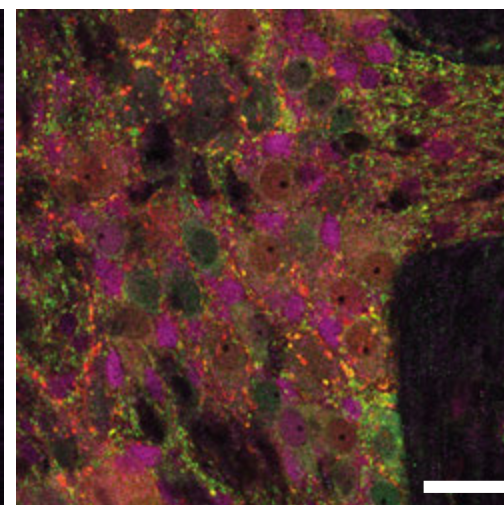


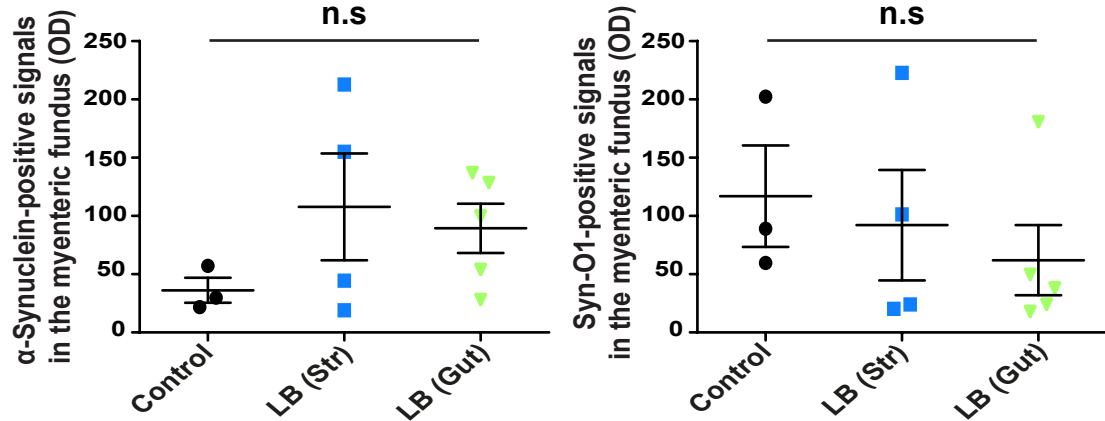
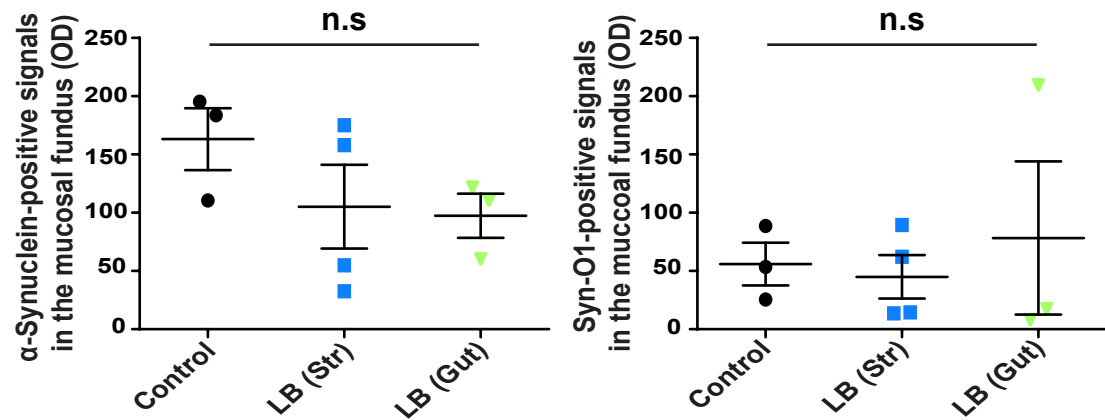
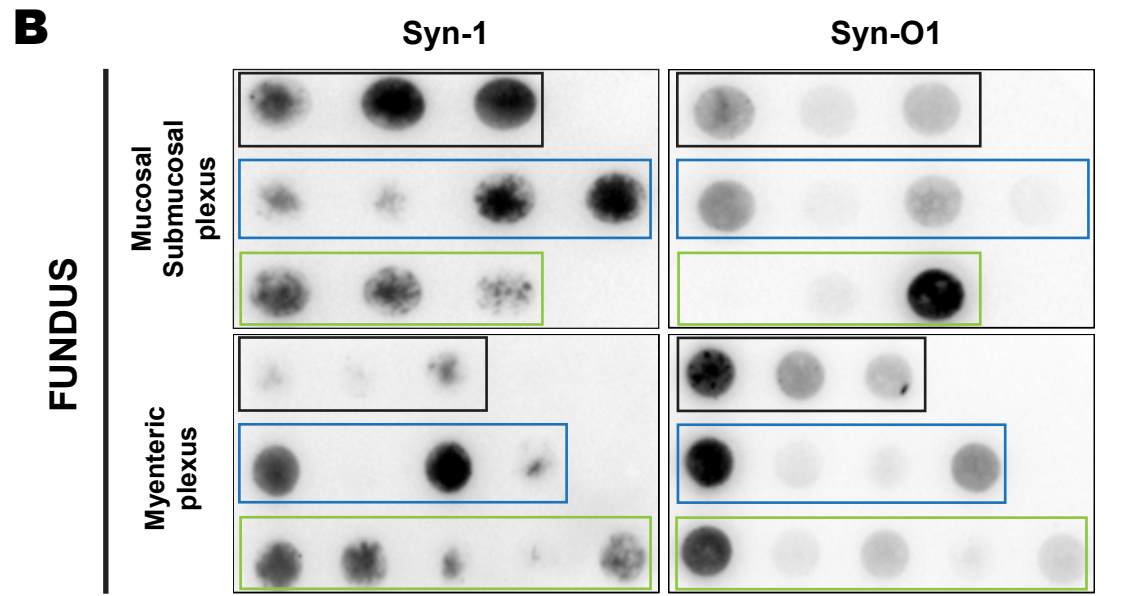
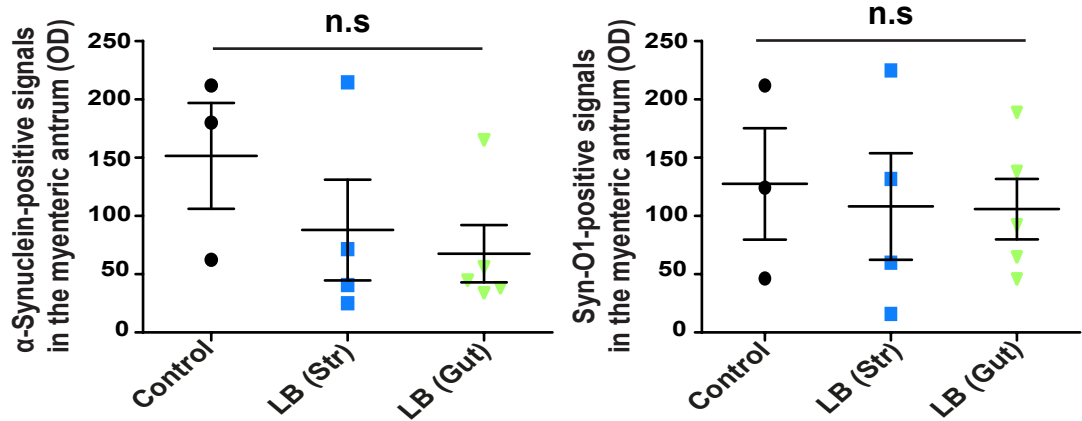
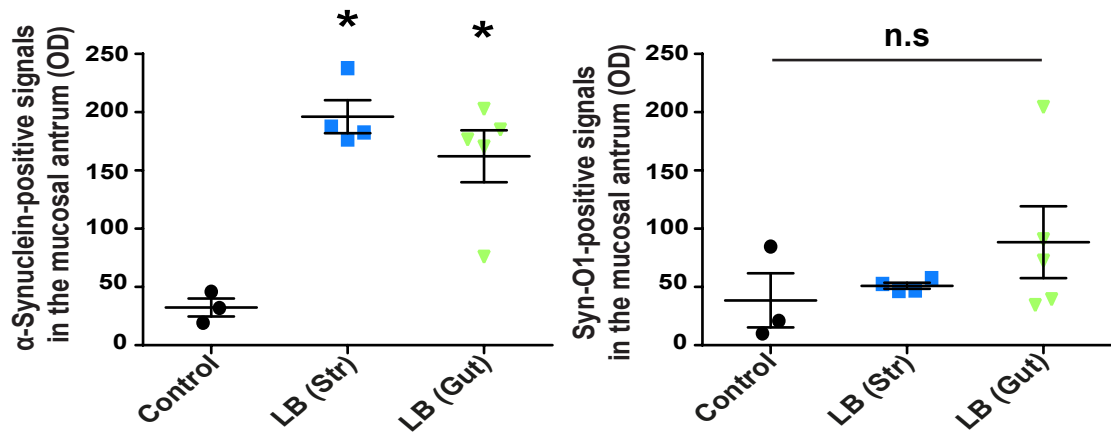
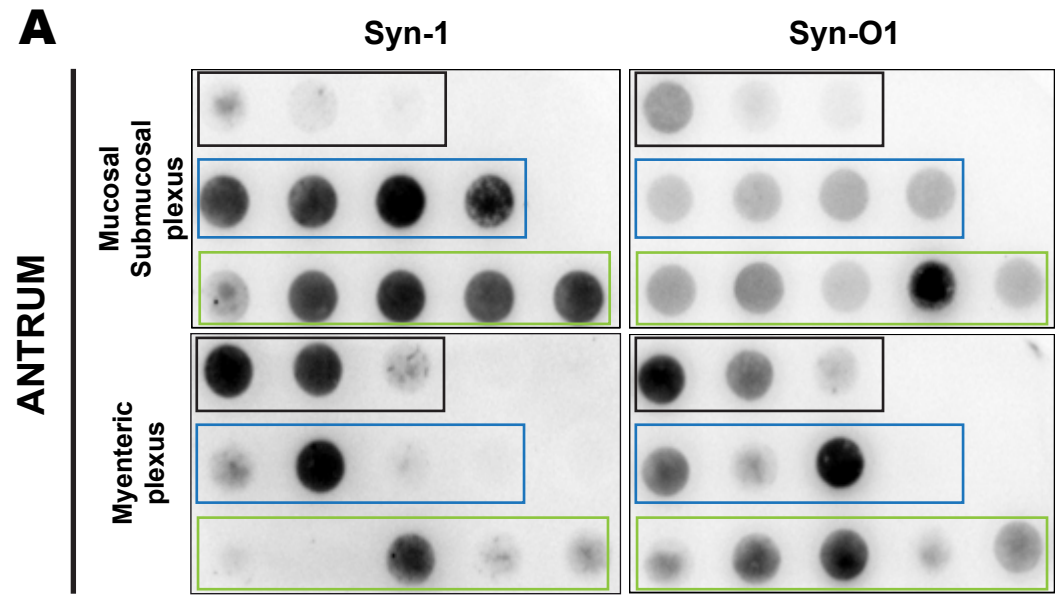
Entorhinal cortex

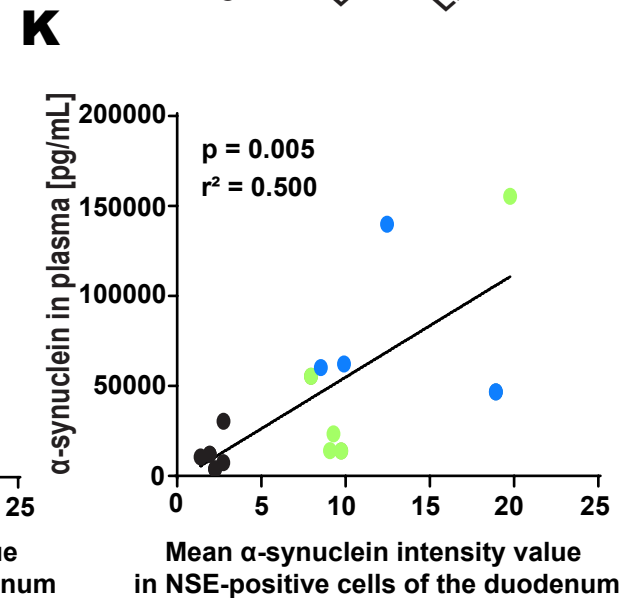
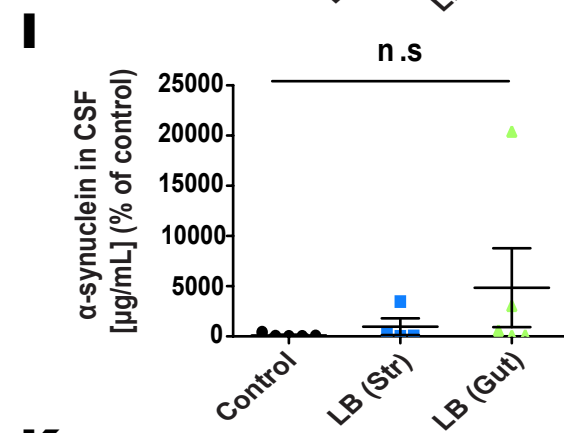
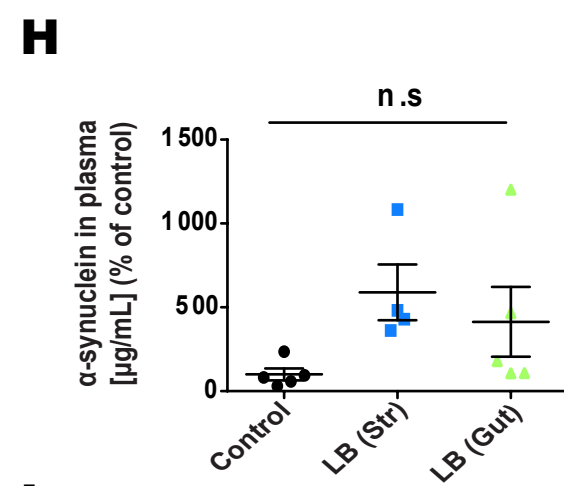
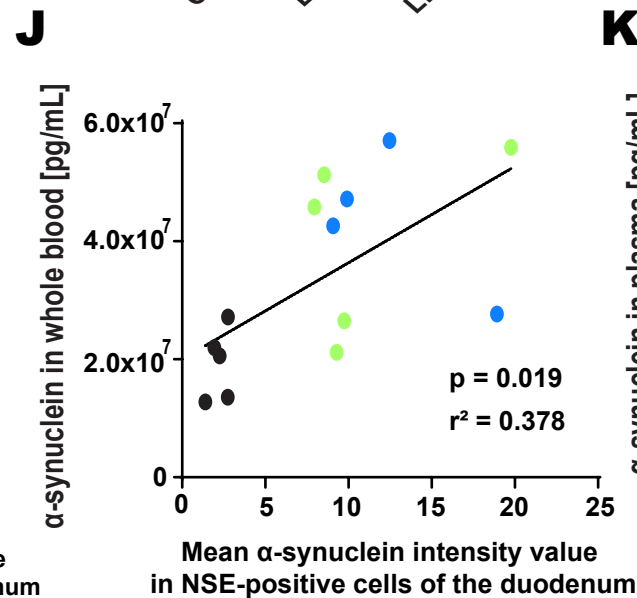
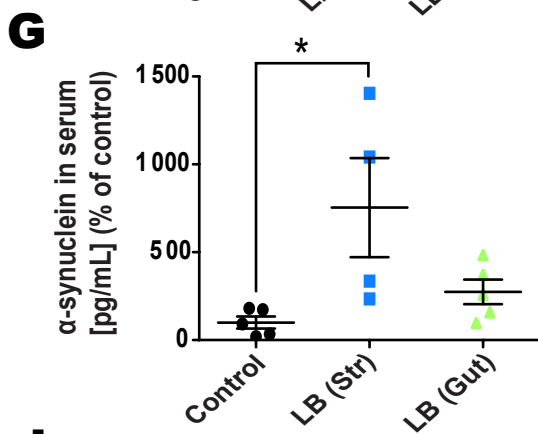
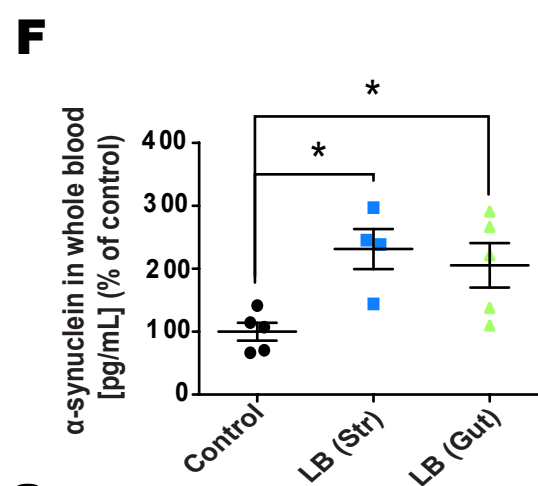
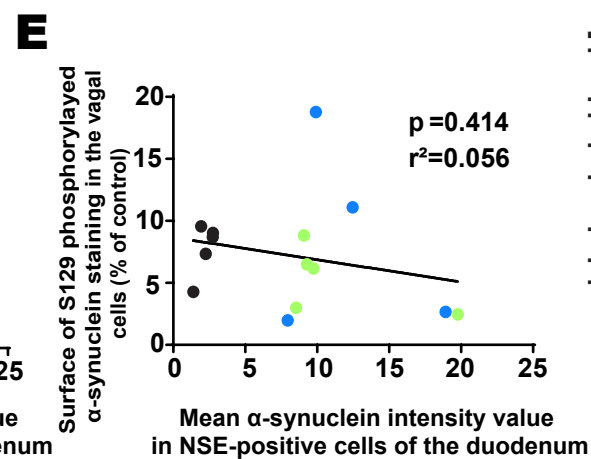
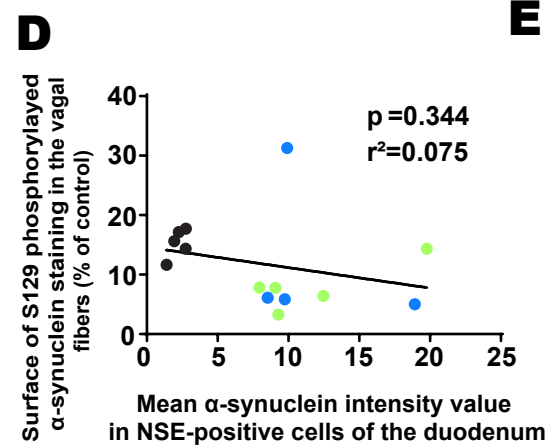
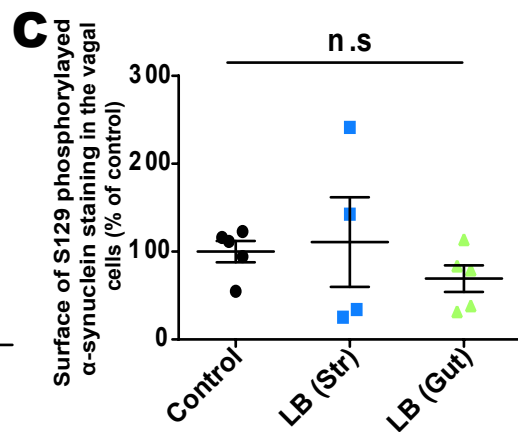
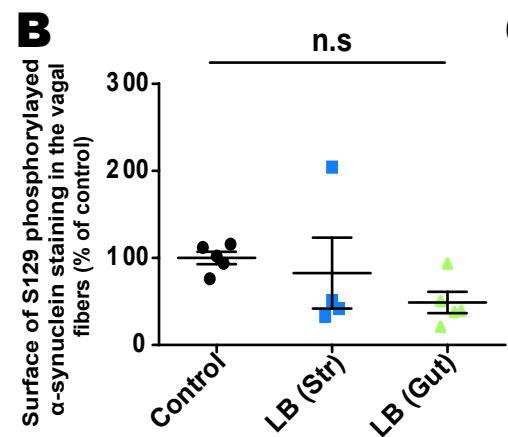
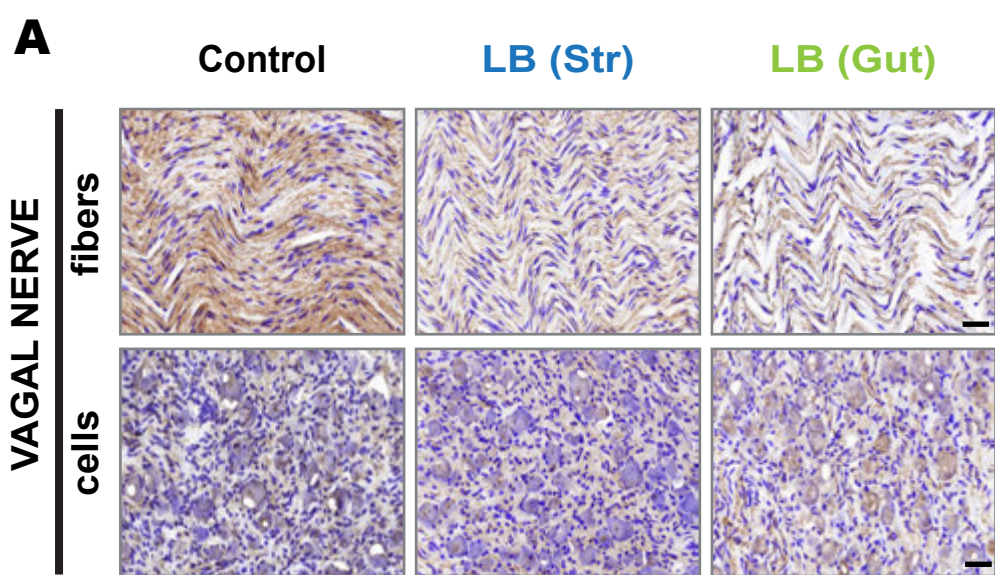


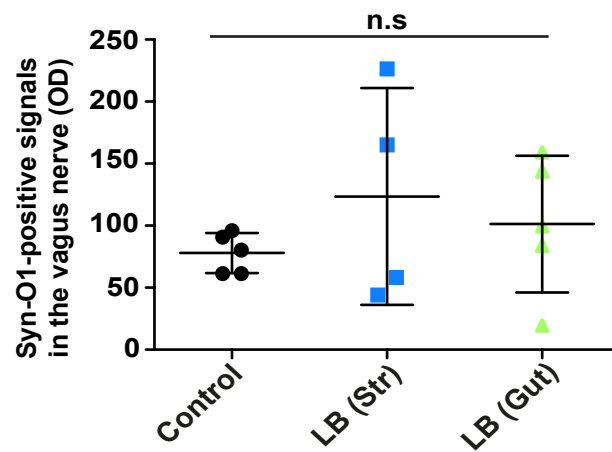
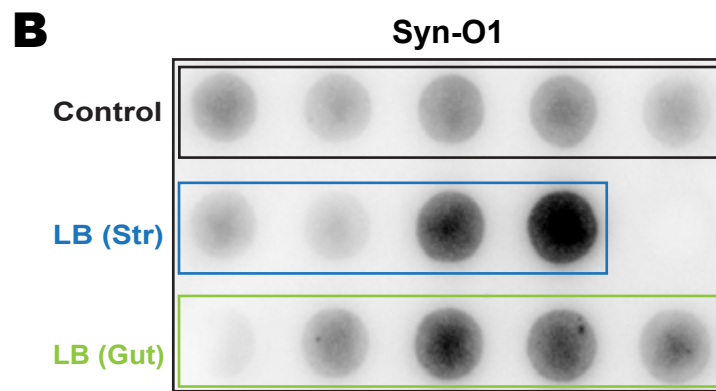
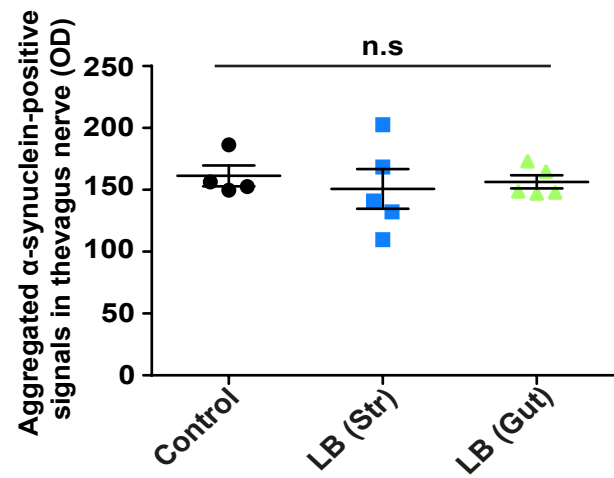
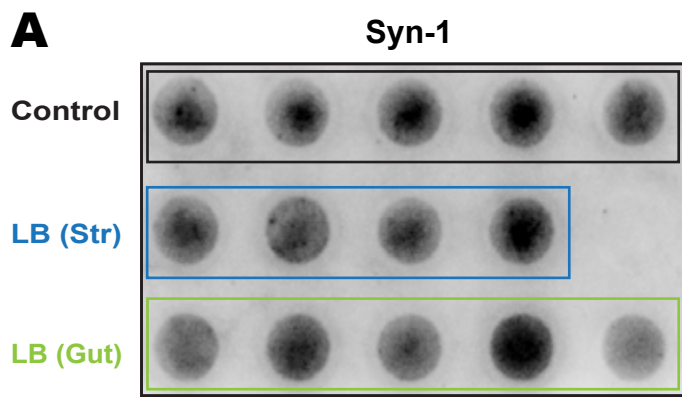
A**Posterior putamen****Anterior putamen****Caudate nucleus****B****ANTRUM****Myenteric plexus****Mucosal/Submucosal plexus****FUNDUS****Myenteric plexus****Mucosal/Submucosal plexus**

A**B**

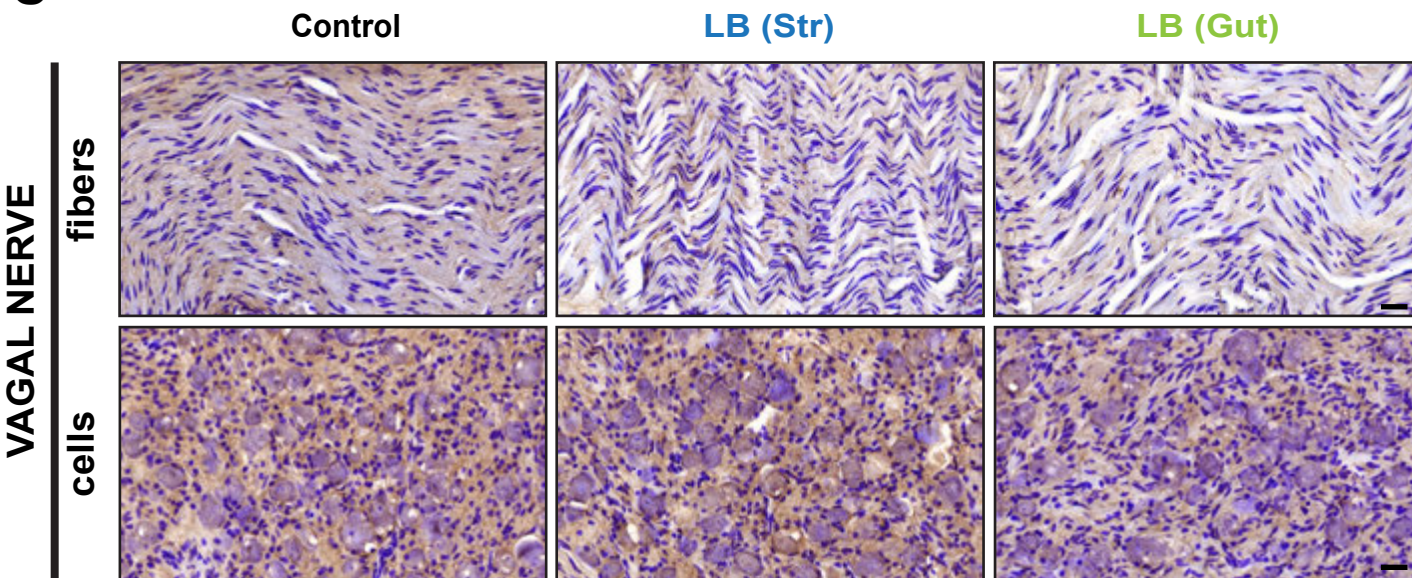
A**NF200****Syn-1****Sox10****Merge****B****NSE****Syn-1****Sox10****Merge**

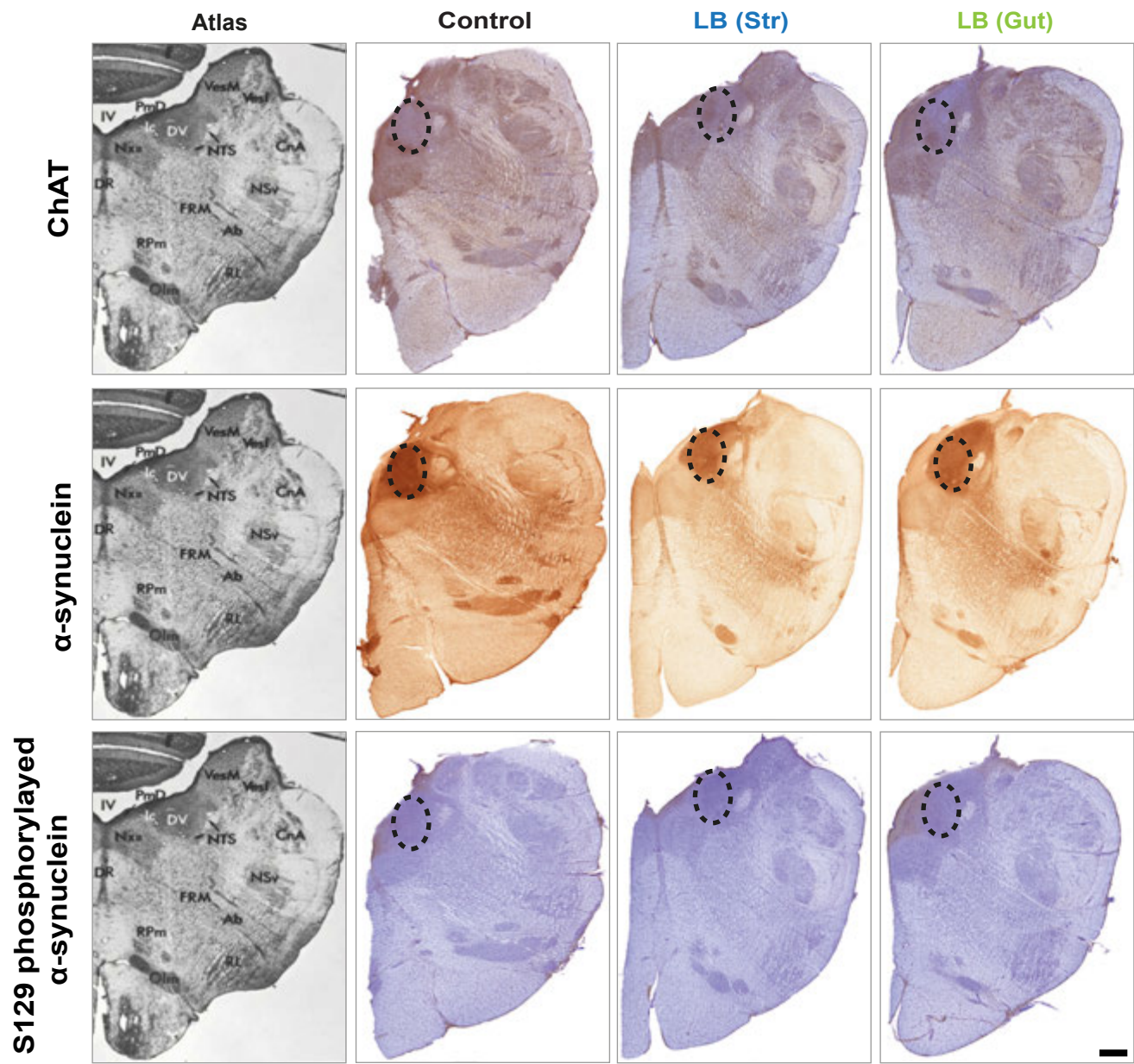
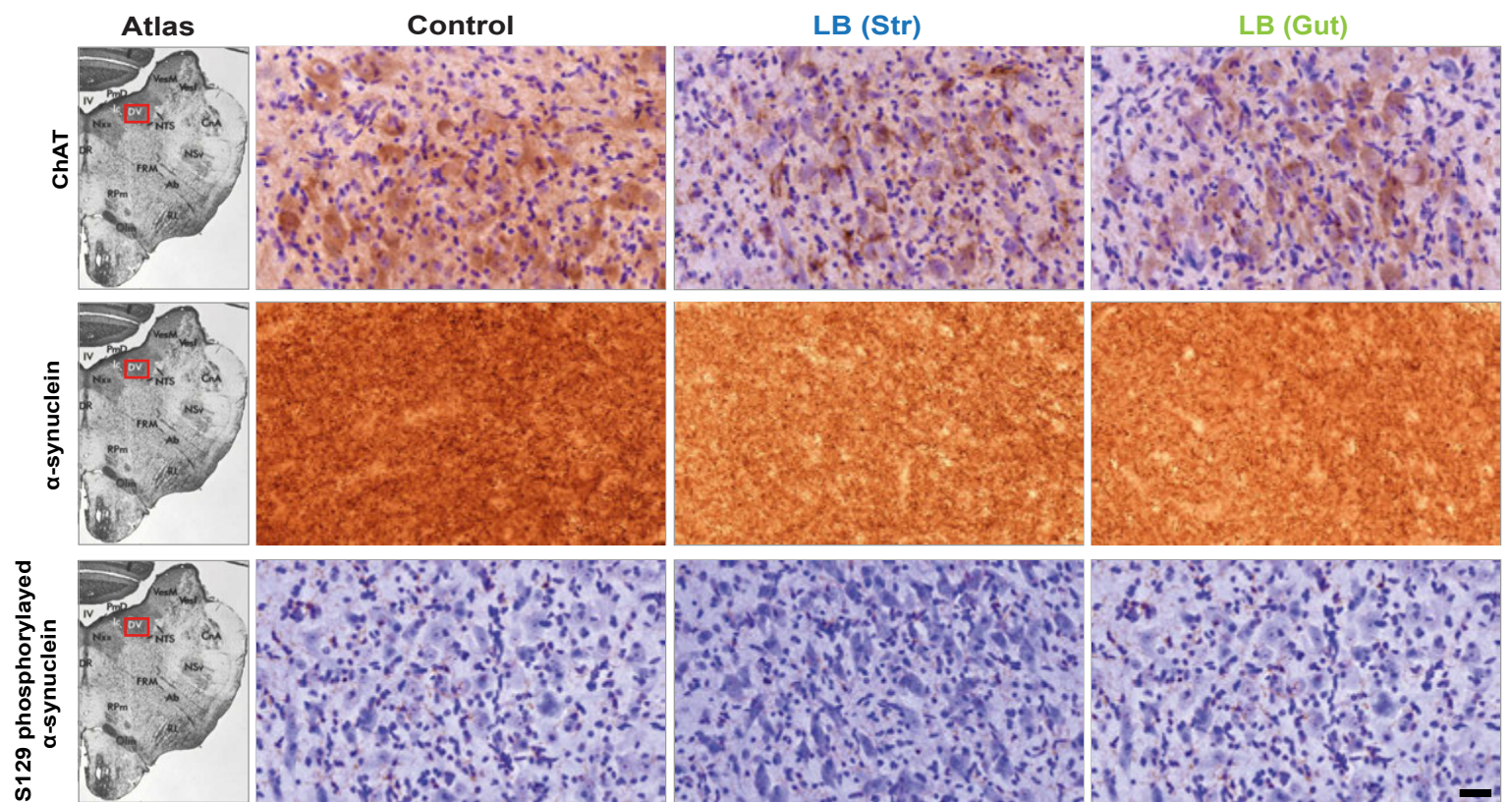






C



A**B**

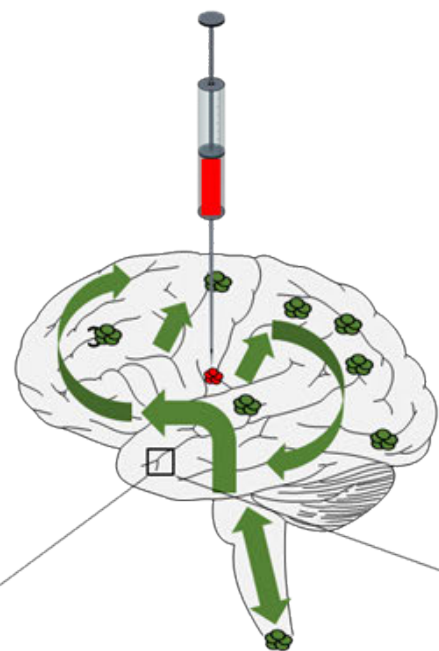
Striatal inoculation of LB fraction from PD patient

Enteric inoculation of LB fraction from PD patient

Legend:

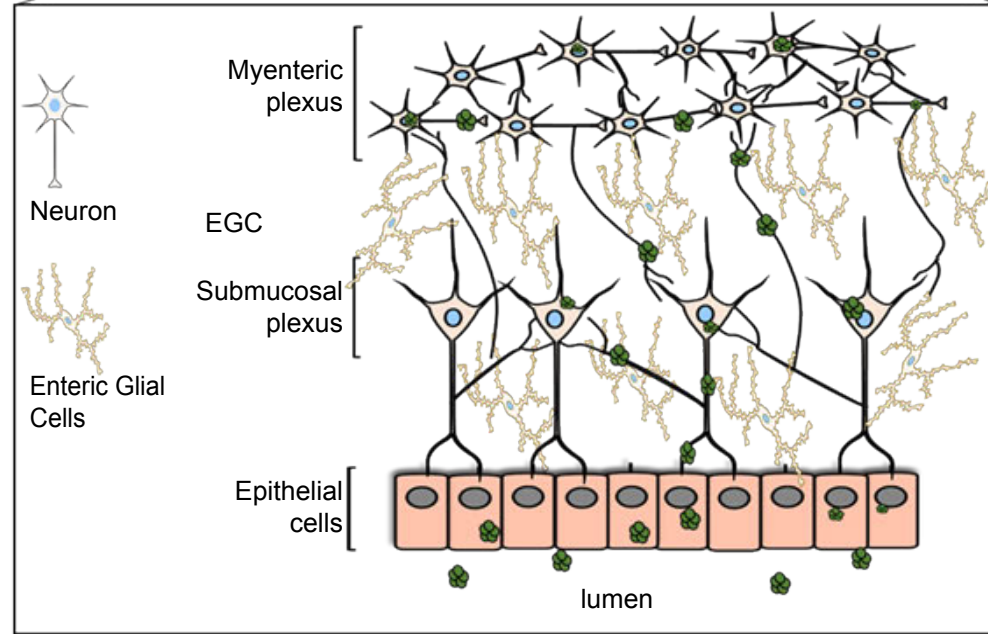
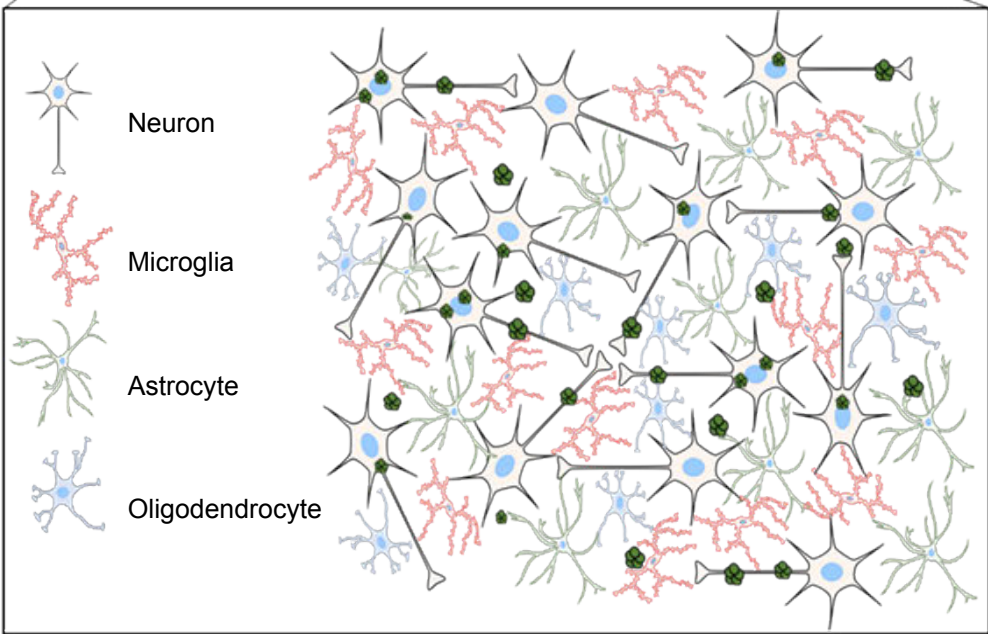
- Exogenous misfolded human α -synuclein (red)
- Endogenous misfolded primate α -synuclein (green)

Bidirectional routes of propagation



CENTRAL NERVOUS SYSTEM

ENTERIC NERVOUS SYSTEM



1 METHODS

2 Methods, including statements of data availability and any associated accession codes and
3 references, are available in the online version of the paper.

4 *Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online*
5 *version of the paper.*

7 ONLINE METHODS

8 Purification of Lewy bodies from human PD Brains

9 The samples were obtained from brains collected in a Brain Donation Program of the Brain
10 Bank “GIE NeuroCEB” run by a consortium of Patients Associations: ARSEP (association
11 for research on multiple sclerosis), CSC (cerebellar ataxias), France Alzheimer and France
12 Parkinson. The consent documents were signed by the patients themselves or their next of kin
13 in their name, in accordance with the French Bioethical Laws. The Brain Bank GIE
14 NeuroCEB (Bioresource Research Impact Factor number BB-0033-00011) has been declared
15 at the Ministry of Higher Education and Research and has received approval to distribute
16 samples (agreement AC-2013-1887). Human SNpc was dissected from fresh frozen
17 postmortem midbrain samples from 5 patients with sporadic PD exhibiting conspicuous nigral
18 LB pathology on neuropathological examination (mean age at death: 75 ± 2.75 years; frozen
19 post-mortem interval: 31.8 ± 7.45 h; GIE Neuro-CEB BB-0033-00011). Tissue was
20 homogenized in 9 vol (w/v) ice-cold MSE buffer (10 mM MOPS/KOH, pH 7.4, 1M sucrose,
21 1mM EGTA, and 1mM EDTA) with protease inhibitor cocktail (Complete Mini; Boehringer
22 Mannheim) with 12 strokes of a motor-driven glass/teflon homogenizer. For LB purification,
23 a sucrose step gradient was prepared by overlaying 2.2 M with 1.4 M and finally with 1.2 M
24 sucrose in volume ratios of 3.5:8:8 (v/v). The homogenate was layered on the gradient and
25 centrifuged at $160,000 \times g$ for 3 h using a SW32.1 rotor (Beckman). Twenty-six fractions of
26 1500 μ l were collected from each gradient from top (fraction 1) to bottom (fraction 26) and
27 analyzed for the presence of α -synuclein aggregates by filter retardation assay, as previously
28 described¹. Further characterization of LB fractions was performed by immunofluorescence,
29 α -synuclein ELISA quantification and electron microscopy as previously described¹. For
30 stereotactic inoculations, LB-containing fractions from PD patients were mixed together in
31 the same proportion (PD#1, fractions 19 and 20; PD#2, fractions 19 and 20; PD#3, fraction
32 22; PD#4, fractions 17,18 and 19; PD#5, fractions 20, 21 and 23). LB fractions were adjusted
33 to ~ 24 pg α -synuclein per microliter of inoculated samples, as measured by a specific
34 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit against human α -synuclein (Invitrogen,

35 #KHB0061) according to the manufacturer's instructions. In all cases, samples were bath-
36 sonicated for 5 min prior to *in vitro* and *in vivo* inoculations.

37

38 **Ethics Statement**

39 Experiments were performed in accordance with the European Union directive of September
40 22, 2010 (2010/63/EU) on the protection of animals used for scientific purposes. The
41 Institutional Animal Care and Ethical Committee of Murcia University (Spain) approved
42 experiments under the license number REGA ES300305440012.

43

44 **Animals and Inoculations**

45 *Monkeys.* Animals were sourced from the research animal facility of the University of
46 Murcia (Murcia, Spain) and housed in 2 multi-male, multi-female exterior pens in a breeding
47 farm. Animals were fed fruit, vegetables and monkey pellets twice a day before 9 am and
48 after 5pm. Water was available ad libitum. Fourteen healthy adult olive baboons (*papio*
49 *papio*) were used in this study. Group sizes were chosen assuming a one-tailed alpha of 0.05,
50 with sample size of at least three per group, which provided >80% power to detect a
51 difference between the treatment groups and the control group, using a Fisher's exact test.
52 Animals were randomized into treatment or control groups. Four baboons were used for
53 intrastriatal inoculations, five were used for enteric inoculations and five were untreated
54 control animals. Intrastriatal inoculations of LB fractions were performed at 2 rostrocaudal
55 levels of the motor striatum (anterior commissure [AC], -1mm and -5mm) under stereotactic
56 guidance as previously described²⁻⁵. The total inoculated volume per hemisphere was 100µl (2
57 inoculation sites with 50µl each at 3µl/min at each location site). After each inoculation, the
58 syringe was left in place for 10 min to prevent leakage along the needle track. For inoculation
59 of LB into the stomach and duodenum ventral wall, the abdominal wall was opened and both
60 stomach and duodenum were exposed as per published procedures⁶. Administration of LB
61 was performed using a 30-G needle slowly inserted into the ventral wall of the stomach and
62 duodenum⁶. To ensure that the solution spreads to the entire ventral wall of the stomach and
63 duodenum, three inoculations per site were performed. The total inoculated volume was
64 100µl, as intrastriatal inoculation.

65 A number of parameters were monitored during the course of the two-year study, including
66 survival and clinical observations. At the end of the experiments (24 months post-
67 inoculation), all monkeys were euthanized with pentobarbital overdose (150mg/kg i.v.),
68 followed by perfusion with room-temperature 0.9% saline solution (containing 1% heparin) in

69 accordance with accepted European Veterinary Medical Association guidelines. Brains were
70 removed quickly after death. Each brain was then dissected along the midline and each
71 hemisphere was divided into three parts. The left hemisphere was immediately freshly frozen
72 by immersion in a cold isopentane bath at -50°C for at least 5 min and stored at -80°C for
73 biochemical investigation. The right hemisphere was post-fixed for one week in 10 vol/tissue
74 of 4% paraformaldehyde at 4°C , cryoprotected in two successive gradients of 20 then 30%
75 sucrose in phosphate buffered saline (PBS) before being frozen by immersion in a cold
76 isopentane bath (-50°C) for at least 5 min and stored immediately at -80°C until sectioning.
77 The thoracic vagus nerve was exposed by blunt dissection. Care was taken during the
78 dissection not to distort the spatial relationship.
79 The thoracic vagus nerves were post-fixed, cryo-protected and frozen, as indicated above for
80 the brain. The stomach and duodenum were removed and placed in a Sylgard-coated Petri
81 dishes containing fresh Hank's buffer saline solution (HBSS, Life Technologies, Courtaboeuf,
82 France). Then, tissue was stretched, pinned flat, and fixed for 3 hours in a solution of
83 phosphate buffer saline (PBS, Life Technologies) containing 4% paraformaldehyde (Sigma-
84 Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Finally, tissue was washed 3 times with PBS and
85 stored in a PBS solution containing 0.1% NaN_3 (Sigma-Aldrich) at 4°C . CSF and blood
86 samples (plasma, serum, whole blood) for all 14 animals were taken before euthanasia. No
87 samples were excluded from analysis in these studies.

88

89 **Histopathological analysis of the brain**

90 *Extent of lesion.* To assess the integrity of the nigrostriatal pathway, tyrosine hydroxylase
91 (TH) immunohistochemistry was performed on SNpc and striatal sections. Briefly, sections
92 from posterior level of the striatum and serial sections (1 in 12) corresponding to the whole
93 SNpc were incubated with a rabbit monoclonal antibody raised against human TH (Abcam,
94 ab137869, 1:1000) and with a mouse monoclonal antibody raised against human TH
95 (Millipore, MAB318, 1:5000) respectively for one night at RT and revealed by an anti-mouse
96 peroxidase EnVisionTM system (DAKO, K400311) followed by DAB visualization. Free-
97 floating SNpc sections were mounted on gelatinized slides, counterstained with 0.1% cresyl
98 violet solution, dehydrated and cover-slipped, while striatal sections were mounted on
99 gelatinized slides and cover-slipped. The extent of the lesion in the striatum was quantified by
100 optical density (OD). Sections were scanned in an Epson expression 10000XL high resolution
101 scanner and images were used in ImageJ open source software to compare the grey level in
102 each region of interest: i.e. caudate nucleus and putamen. TH-positive SNpc cells were

103 counted by stereology, blind with regard to the experimental condition, using a Leica
104 DM6000B motorized microscope coupled with the Mercator software (ExploraNova, France).
105 The SNpc was delineated for each slide and probes for stereological counting were applied to
106 the map obtained (size of probes was 100x80µm spaced by 600x400µm). Each TH-positive
107 cell with its nucleus included in the probe was counted. The optical fractionator method was
108 finally used to estimate the total number of TH-positive cells in the SNpc of each monkey
109 hemisphere. In addition, we measured Nissl cell count, the volume of SNpc, and the surface
110 of TH-occupied in SNpc to fully characterize the pattern of dopaminergic loss in the SNpc.
111 *α-synuclein pathology.* Synucleinopathy was assessed with a mouse monoclonal antibody
112 raised against human α-synuclein (clone syn211, Thermo Scientific, MS1572, 1:1000) and
113 phosphorylated α-synuclein (clone 11A5, Elan, 1:10000) immunostaining as previously
114 reported^{1,7}. Briefly, selected sections at two rostro-caudal levels were specifically identified
115 and incubated in a same well to allow direct comparison of immunostaining intensity.
116 Sections were incubated overnight at room temperature with the aforementioned antibodies.
117 The following day, sections were incubated with anti-species peroxidase EnVision™ system
118 (DAKO) followed by 3,3'-diaminobenzidine (DAB) incubation. Sections were then mounted
119 on gelatinized slides, dehydrated, counter-stained if necessary with 0,1% cresyl violet and
120 cover-slipped until further analysis. Grey level quantification or immunostaining-positive
121 surface quantification in twenty brain regions (**Fig. 1E and Supplementary Fig. 3-4**) were
122 performed as previously described⁷. All analyses were evaluated evaluator-blinded.

123

124 **Histopathological analysis of the thoracic vagal nerve**

125 Longitudinal 10µm cryosections of the vagus nerve were made for each animal. Two
126 representative sections by animal were used to assess synucleinopathy. All slides were
127 incubated together with either a mouse monoclonal antibody raised against phosphorylated α-
128 syn (clone 11A5, Elan, 1:10000) or a mouse monoclonal antibody against aggregated α-syn
129 (clone 5G4, Millipore MABN389, 1: 1000) and revealed by an anti-mouse peroxidase
130 EnVision™ system followed by DAB visualization and counter-stained with 0.1% cresyl
131 violet like previously described for the brain sections. Slides were scanned with a high-
132 resolution scanner (PanScan, 3D Histech, France) at x20 magnification and on 5 layers. The
133 extended picture obtained is used to analyze the positive surface of the phosphorylated α-syn
134 staining based on a selective color threshold within the fiber or cell areas of the vagal nerve.

135

136 **Histopathological analysis of the dorsal motor nucleus of the vagus (dmnX)**

137 Coronal 50µm serial cryosections of the dorsal motor nucleus of the vagus (dmnX) were
138 made for each animal (1 by 6). Three adjacent series of sections were used by animal to assess
139 choline acetyltransferase (ChAT) and synucleinopathy. Free floating sections were incubated
140 with either a goat polyclonal antibody raised against ChAT (AB144P, Millipore, 1:1000), a
141 mouse monoclonal antibody raised against human α -synuclein (clone syn211, Thermo
142 Scientific, MS1572, 1:1000) or a mouse monoclonal antibody raised against
143 phosphorylated α -syn (Abcam, ab51253, 1:5000), revealed by a specific anti-species
144 peroxydase polymer detection system (anti-goat ImmPress Vector, MP7405 or anti-
145 mouse/rabbit peroxidaseEnVisionTM, Agilent K400111-2/K400311-2) followed by DAB
146 visualization (DAKO, K346811-2). Sections were then mounted on slides and counter-stained
147 with 0.1% cresyl violet like previously described for the brain sections. All slides were
148 scanned with a high-resolution scanner (PanScan, 3D Histech, France) at x20 magnification
149 on 5 layers of 1µm each. The extended picture obtained is used to illustrate the dmnX location
150 (based on the ChAT signal) and the α -syn and phosphorylated α -syn staining within the
151 dmnX.

152

153 **Histopathological analysis of the enteric nervous system**

154 Layers of tissue containing the myenteric plexus were separated by microdissection. Samples
155 were permeabilized for 4h in a 4% horse serum/PBS blocking buffer containing 0,5% Triton
156 X-100 (Sigma-Aldrich), and incubated overnight at 4°C with the following primary
157 antibodies diluted in the blocking buffer: mouse anti-Syn 1 (1:200; 610787, BD Bioscience,
158 Le pont de Claix, France), rabbit anti-Human NF200 (1:250; ab8135, Abcam, France), goat
159 anti-human Sox10 (1:250; sc-17343, Santa Cruz Biotechnology, France), rabbit anti-Human
160 Neuron specific enolase (NSE) (1:3000; 17437; Polysciences Inc, USA). Following
161 incubation with primary antibodies, tissues were washed with PBS and incubated for 3 hours
162 at room temperature with a combination of donkey anti-mouse IgG conjugated to CY5
163 (1:500; 715-175-151, Jackson Immunoresearch, Interchim, Montluçon, France), donkey anti-
164 goat IgG conjugated to CY2 (1:500; FP-SA2110, Interchim, France) and donkey anti-rabbit
165 IgG conjugated to CY3 (1:500; 711-165-152, Jackson Immunoresearch, Interchim,
166 Montluçon, France). Tissues were then washed with PBS and mounted with ProLong Gold
167 antifade reagent (P36930, Thermo fisher, Illkirch, France).

168

169 **Biochemical analysis.**

170 *Total protein extraction and quantification.* Tissue patches (n=5) of substantia nigra, putamen
171 and caudate nucleus were extracted on ice using 100µl of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH
172 7.4, 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate)
173 with a protease inhibitor cocktail tablet (Complete Mini, Roche Diagnostics). Tissue from
174 antrum and fundus were extracted on ice using 500µL SDS-Urea 8%. In both cases, lysates
175 were incubated on ice for 20 min then centrifuged at 14,000rpm for 15 min at 4°C. The
176 supernatants were collected and the total amount of protein in the lysates were determined by
177 Bicinchoninic Acid (BCA) Assay prior to storage at -80°C. Based on total protein
178 concentrations calculated from the BCA assays, aliquots of tissue lysates corresponding to
179 known amounts of total protein per dot were prepared for each animal in Laemmli buffer
180 (Tris-HCl 25mM pH=6.8, Glycerol 7.5%, SDS 1%, DTT 250mM and Bromophenol Blue
181 0.05%) for dot-blotting experiments.

182 *Dot-blot analysis of α -synuclein.* This technique was performed as previously described^{1,8}.
183 After heating at 100 °C for 5 min, 20 µg of protein extract was diluted in buffer (25 mM Tris-
184 HCl, 200 mM Glycine, 1% SDS) and filtered through either a nitrocellulose membrane or an
185 acetate cellulose membrane (Bio-Rad, 0.2 µm pore size). Membranes were then saturated in
186 5% dry-skimmed milk in PBS and probed with antibodies against α -synuclein (syn211,
187 1:1000), both α -synuclein fibrils and α -synuclein oligomers (Syn-O1, 1:10000) (kindly
188 provided by Prof. Omar El-Agnaf)^{9,10}. Appropriate secondary antibodies coupled to
189 peroxidase were revealed using a Super Signal West Pico Chemiluminescent kit (Immobilon
190 Western, Chemiluminescent HRP substrate, Millipore). Chemiluminescence images were
191 acquired using the ChemiDoc+XRS system measurement (BioRad). Signals per lane were
192 quantified using ImageJ and a ratio of signal on loading per animal was performed and used
193 in statistical analyses.

194 *Human α -Synuclein aggregation TR-FRET immunoassay.* Time-resolved Förster's resonance
195 energy transfer (TR-FRET)-based immunoassays were validated for total and oligomeric α -
196 synuclein¹¹. Ten microliters of brain and ENS samples were analyzed for total α -synuclein
197 quantification with the TR-FRET immunoassays kit against human α -synuclein aggregation
198 kit (Cisbio, #6FASYPEG) according to the manufacturer's instructions.

199 *Vagal nerve protein extraction.* We used around 2 mm³ formalin-fixed tissue/per animal.
200 Protein was extracted using the Qproteome FFPE Tissue Kit (Qiagen), and then quantified
201 using the Lowry method (Biorad RC DC Protein Assay Kit, France) following the
202 manufacturer's instructions. 50µg of protein was used for dot-blotting experiment.

203

204 **Measurement of α -synuclein in monkey biological fluids samples.** Multi-Array 96-well
205 plates (MesoScale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) were coated with 30 μ l of 3 μ l/ml
206 MJFR1 (abcam, Cambridge, UK) as capture antibody and incubated overnight at 4°C without
207 shaking. The next day plates were washed 3 times with 150 μ l PBS-T [PBS (AppliChem,
208 Darmstadt, Germany) supplemented with 0,05% Tween-20 (Roth, Karlsruhe, Germany)] per
209 well. Unspecific binding of proteins was prevented by incubation with 150 μ l 1% BSA
210 (SeraCare Life Sciences, Milford, MA, USA)/PBS-T/well for 1 hour and shaking at 700rpm.
211 Calibrators (kindly provided by Prof. Omar El-Agnaf) were prepared from single use aliquots
212 of α -synuclein (1 μ g/ml stored at -80°C until use) and ranged from 25000pg/ml to 6,1pg/ml in
213 serial fourfold dilutions. 1% BSA/PBS-T served as blank. For the different specimen the
214 following dilutions were applied: 1 in 10000 for whole blood and 1 in 8 for serum, plasma
215 and CSF. All dilutions were prepared in 1% BSA/PBS-T. After washing the plates 25 μ l
216 calibrator solutions and diluted samples were applied to the wells and incubated as indicated
217 above. Plates were washed again and 25 μ l Sulfo-TAG labeled Syn1 antibody (BD
218 Biosciences, Heidelberg, Germany) diluted to 1 μ g/ml in 1% BSA/PBS-T were applied to the
219 wells as detection antibody. Sulfo-TAG labeling was done according to the manufacturer's
220 instruction using MSD Sulfo-TAG NHS-Ester (MSD). Incubation was for 1 hour at 700rpm.
221 Plates were washed, 150 μ l 2x Read Buffer (MSD) was applied and the plates were read on a
222 MSD SectorImager 2400. Data analysis was performed using WorkBench software (MSD).

223

224 **Statistical analysis.** Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 8.0 (GraphPad
225 Software, Inc., San Diego, CA). For all experiments, comparisons among means were
226 performed by using One-way analysis of variance (ANOVA) followed, if appropriate, by a
227 pairwise comparison between means by Tukey *post-hoc* analysis. All values are expressed as
228 the mean \pm standard error of the mean. Correlations between variables were assessed with
229 Spearman's correlation analysis, and we estimated effect size with Cohen's d. In all analyses,
230 statistical significance was set at p <0.05.

231

232 **Data availability**

233 The data supporting the findings of this study are available from the corresponding authors
234 upon reasonable request.

235

236 **References**

- 237 1. Recasens, A., *et al.* Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-
238 synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol* **75**, 351-362
239 (2014).
- 240 2. Ahmed, M., *et al.* Lentiviral overexpression of GRK6 alleviates L-dopa-induced
241 dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Sci Transl Med* **2**, 28ra28 (2010).
- 242 3. Fasano, S., *et al.* Inhibition of Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1)
243 signaling in the striatum reverts motor symptoms associated with L-dopa-induced dyskinesia.
244 *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21824-21829 (2010).
- 245 4. Porras, G., *et al.* PSD-95 expression controls l-DOPA dyskinesia through dopamine
246 D1 receptor trafficking. *J Clin Invest* **122**, 3977-3989 (2012).
- 247 5. Urs, N.M., *et al.* Targeting beta-arrestin2 in the treatment of L-DOPA-induced
248 dyskinesia in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E2517-2526 (2015).
- 249 6. Miwa, H., Kubo, T., Suzuki, A. & Kondo, T. Intragastric proteasome inhibition
250 induces alpha-synuclein-immunopositive aggregations in neurons in the dorsal motor nucleus
251 of the vagus in rats. *Neurosci Lett* **401**, 146-149 (2006).
- 252 7. Bourdenx, M., *et al.* Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration
253 triggered by alpha-synuclein overexpression. *Acta Neuropathol Commun* **3**, 46 (2015).
- 254 8. Bourdenx, M., *et al.* Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical
255 neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies.
256 *Prog Neurobiol* **155**, 171-193 (2017).
- 257 9. Vaikath, N.N., *et al.* Generation and characterization of novel conformation-specific
258 monoclonal antibodies for alpha-synuclein pathology. *Neurobiol Dis* **79**, 81-99 (2015).
- 259 10. Helwig, M., *et al.* Brain propagation of transduced alpha-synuclein involves non-
260 fibrillar protein species and is enhanced in alpha-synuclein null mice. *Brain* **139**, 856-870
261 (2016).
- 262 11. Bidinosti, M., *et al.* Novel one-step immunoassays to quantify alpha-synuclein:
263 applications for biomarker development and high-throughput screening. *J Biol Chem* **287**,
264 33691-33705 (2012).
- 265

PARTIE 2 : Combattre l'accumulation de l' α -synucléine en augmentant sa dégradation via l'autophagie

Projet 5 : Evaluation de la dysfonction autophagique chez les patients atteints d'atrophie multisystématisée

1. Contexte de l'étude :

L'activité du système autophagique chez les patients atteints d'atrophie multisystématisée n'a été que peu étudiée dans les années précédentes.

Une équipe a démontré qu'une altération des protéines autophagosomales était présente dans les cerveaux des patients atteints d'AMS avec une diminution du récepteur GABARAP et une augmentation de l'isoforme LC3-II et de la protéine p62, tous trois impliqués dans la formation des autophagosomes (**Tanji *et al.*, Neurobiol Dis, 2013**). De plus, les inclusions cytoplasmiques gliales positives pour l' α -synucléine présentes au sein des oligodendrocytes s'avèrent également immunoréactives pour la protéine LC3 (**Tanji *et al.*, Neurobiol Dis, 2013**). Ce dernier résultat suggère que LC3 est piégé dans les inclusions et que les inclusions cytoplasmiques gliales, dont l'origine et la signification restent encore mal connues, peuvent dériver d'autophagosomes non dégradés. La protéine LC3-II s'accumulent également au sein d'iPSCs dérivées de fibroblastes épithéliaux de patients AMS, suggérant là aussi un déficit autophagique intracellulaire (**Monzio Compagnoni *et al.*, Stem Cell Reports, 2018**). Enfin, les fibres du système ponto-cérébelleux des patients atteints d'AMS présentent une augmentation des niveaux de LAMP1 et LAMP2, associée à une distribution intra-cellulaire anormale de ces récepteurs lysosomiaux (**Makioka *et al.*, Neuroreport, 2012**).

Ces premières données indiquent ainsi une altération générale du système autophagique chez les patients atteints d'AMS mais demandent une caractérisation plus poussée de ce déficit. Nous avons eu l'opportunité d'obtenir des échantillons de six cerveaux de patients contrôles et sept cerveaux de patients atteints d'AMS de phénotype parkinsonien par la banque de cerveaux GIE Neuro-CEB afin d'explorer cette altération par des approches biochimiques.

2. Objectif de l'étude :

Nous avons cherché à caractériser plus précisément la dysfonction autophagique présente dans le cerveau des patients atteints d'AMS.

3. Design expérimental :

Tissus humains :

Nous avons à notre disposition les tissus du putamen et du cortex frontal provenant de cerveaux de six individus contrôles et sept patients atteints d'atrophie multisystématisée de phénotype parkinsonien (âge moyen de la mort : 72 ± 2.83 ans ; intervalle post-mortem : 27.5 ± 6.65 h; GIE Neuro-CEB BB-0033-00011) (**Table 3**).

Identification	Diagnostic	Age (années)	Sexe	Intervalle post-mortem (heures)
1	Contrôle	84	M	15.5
2	Contrôle	79	M	Nd
3	Contrôle	69	M	6
4	Contrôle	83	F	21
5	Contrôle	80	M	4
6	Contrôle	78	M	23
7	AMS-p	54	M	5.25
8	AMS-p	64	F	6.5
9	AMS-p	60	F	Nd
10	AMS-p	57	F	7
11	AMS-p	75	M	72
12	AMS-p	78	F	48
13	AMS-p	77	M	39

Table 3 : Données démographiques des sujets contrôles et des patients atteints d'AMS parkinsonien (AMS-p) utilisés dans cette étude. M : male, F : femelle. Nd : Non déterminé

Extraction des protéines :

Les tissus frais post-mortem du putamen et du cortex frontal sont extraits sur glace dans 1mL de tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate), couplé à un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche Diagnostics). Le lysat est incubé sur glace pendant 20 min avant une centrifugation à 14000rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est ensuite collecté et un essai d'acide bicinchoninique (Bicinchoninic Acid Assay – BCA - ThermoFisher Scientific, USA) est utilisé pour déterminer la quantité totale de protéines dans les lysats, avant d'être stockés à -80°C. Des aliquots correspondant à une concentration fixée de protéines totales sont préparés pour

chaque échantillon dans un tampon Laemmli (Tris-HCl 25mM pH=6.8, Glycerol 7.5%, SDS 1%, DTT 250mM and Bromophenol Blue 0.05%) pour les expériences d'immunoblot.

Immunoblot :

Les échantillons protéiques sont chargés dans des gels acrylamide de 8 à 12% et séparés par SDS-PAGE avant un transfert sur une membrane de nitrocellulose (0,2µm – Biorad – USA). Les membranes sont ensuite bloquées dans un tampon PBS-lait 5% avant une incubation sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire : anti-mTOR (Cell Signaling Technology, #2972S), anti-Beclin-1 (Novus Biological, #NB500-249), anti-p70S6 (Cell Signaling Technology, #9205S), anti-phosphoThr389-p70S6 (Cell Signaling Technology, #9205), anti-LC3 (Novus Biological, #NB100-2220). Une incubation avec un anticorps anti-actine sert de contrôle de charge. Les anticorps secondaires adéquats couplés à la peroxydase sont ensuite utilisés avant une révélation à l'aide du kit de révélation (Super Signal West Pico Chemiluminescent kit - Immobilon Western, Chemiluminescent HRP substrate, Millipore). La chimioluminescence des images est acquise à l'aide d'un système d'analyse ChemiDoc+XRS (BioRad). Le signal par puit est quantifié à l'aide du logiciel ImageJ et normalisé par l'actine avant une analyse statistique.

4. Résultats :

Cortex frontal : Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux niveaux protéiques de mTOR, p70S6 kinase (p70S6 totale et phospho-p70S6) et des isoformes LC3-I et LC3-II dans le cortex frontal des patients AMS-p, comparé aux sujets contrôles (**Figure 39**). Les niveaux protéiques de la protéine mTOR ne diffèrent pas significativement dans le cortex des patients AMS-p, comparé aux individus sains (**Figure 39A**). Nous avons montré, dans le cortex frontal des patients AMS-p, une diminution drastique de l'activation de la protéine p70S6, mise en évidence par la diminution du ratio de la forme phosphorylée de la protéine p70S6 rapportée à la quantité totale de la protéine p70S6 (**Figure 39B**). Nous avons également démontré une accumulation protéique significative de l'isoforme LC3-II (**Figure 39C**).

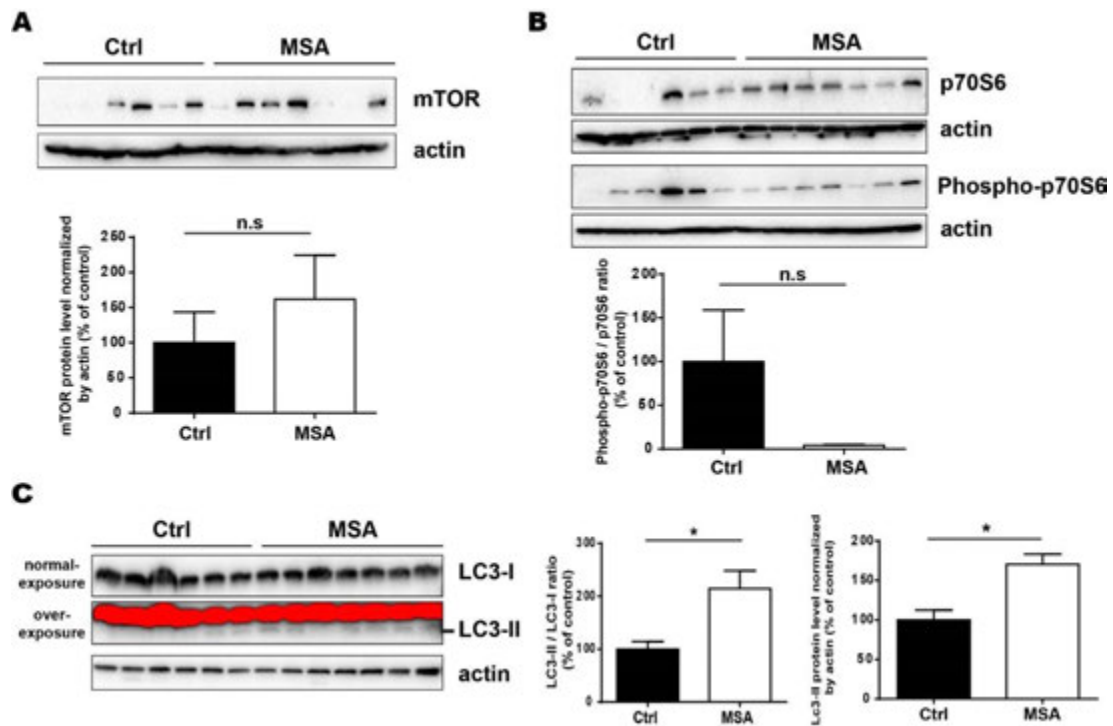


Figure 39 : Mesure des niveaux protéiques de mTOR, p70S6 et phospho-p70S6, et LC3 (I et II) dans le cortex frontal des sujets contrôles et des patients atteints d'AMS-parkinsonien. (A) Images représentatives et quantification des niveaux de la protéine mTOR, normalisés par l'actine. (B) Images représentatives et quantification du ratio des niveaux de la forme phosphorylée de p70S6 divisés par les niveaux totaux de la protéine p70S6, normalisés par l'actine. (C) Images représentatives et quantification des niveaux de la protéine LC3 sous ses isoformes I et II, normalisés par l'actine. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test t-test non paramétrique. n.s : non significatif, * $p < 0.05$ comparé au groupe contrôle.

Putamen: Nous nous sommes ensuite intéressés aux niveaux protéiques de mTOR, p70S6 kinase (p70S6, phospho-p70S6), des isoformes LC3-I et LC3-II et de la protéine Beclin-1 dans le putamen des patients AMS-p, comparé aux sujets contrôles (**Figure 40**). Nous avons mis en évidence chez les patients AMS-p une diminution protéique significative des protéines mTOR (**Figure 40A**) et Beclin-1 (**Figure 40B**) ainsi qu'une activation de la protéine p70S6 (i.e augmentation du ratio de la forme phosphorylée de la protéine p70S6 divisée par la quantité totale de la protéine p70S6) (**Figure 40C**) et une accumulation significative de l'isoforme LC3-II (**Figure 40D**).

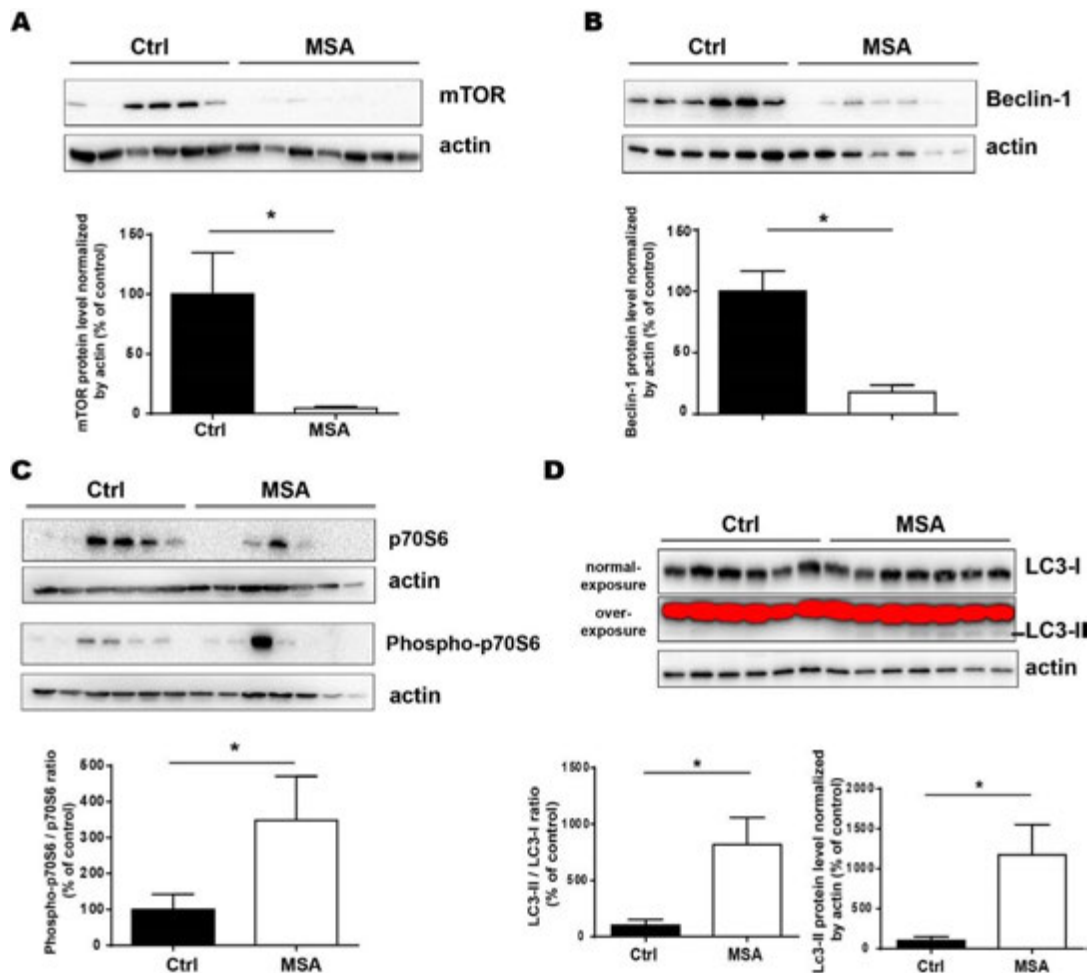


Figure 40: Mesure des niveaux protéiques de mTOR, Beclin-1, p70S6 et phospho-p70S6, et LC3 (I et II) dans le putamen des sujets contrôles et des patients atteints d'AMS-parkinsonien. (A) Images représentatives et quantification des niveaux de la protéine mTOR, normalisés par l'actine. (B) Images représentatives et quantification des niveaux de la protéine Beclin-1, normalisés par l'actine. (C) Images représentatives et quantification du ratio des niveaux de la forme phosphorylée de p70S6 divisés par les niveaux totaux de la protéine p70S6, normalisés par l'actine. (D) Images représentatives et quantification des niveaux de la protéine LC3 sous ses isoformes I et II, normalisés par l'actine. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test t-test non paramétrique. n.s : non significatif, * $p < 0.05$ comparé au groupe contrôle.

5. Discussion :

Les patients atteints d'AMS utilisés dans l'étude sont de phénotype parkinsonien, suggérant une atteinte importante de la voie nigro-striée et donc du putamen. Dans le cortex frontal, bien que cette zone soit moins affectée dans la pathologie associée au phénotype parkinsonien, on observe tout de même une augmentation des niveaux de LC3-II de manière mTOR-indépendante (Table 4), suggérant un début de déficit autophagique dans cette région.

	Cortex frontal	Putamen
mTOR	→	↘
Phospho-p70S6/p70S6	↘	↗
LC3-II	↗	↗
Beclin-1	Nd	↘

Table 4 : Bilan des résultats obtenus concernant les taux protéiques des marqueurs autophagiques étudiés dans ce projet dans le cortex frontal et le putamen des patients atteints d'AMS parkinsonien par rapport aux sujets sains. Nd : non déterminé.

Au sein du putamen, nous avons observé une diminution de la quantité de la protéine mTOR (**Table 4**). Ce récepteur, lorsqu'il est actif sous une forme phosphorylée, inhibe l'initiation de la macroautophagie (**Figure 41**). Ainsi, une diminution de la quantité de mTOR entraîne une levée indirecte de l'inhibition autophagique, entraînant une activation de l'autophagie.

Cette activation autophagique est retrouvée dans le putamen de ces patients avec une augmentation des niveaux de LC3-II (**Table 4**), marqueur des autophagosomes, suggérant soit une augmentation de la production d'autophagosomes soit une diminution de leur dégradation dans le putamen des patients AMS-p.

Bien que mTOR active la protéine p70S6 en la phosphorylant (**Figure 41**), nous observons une augmentation des niveaux phosphorylés de p70S6 dans le putamen associée à la diminution de mTOR (**Table 4**). Ceci peut être expliqué par la présence d'une voie mTOR-indépendante d'activation de la protéine p70S6 telle que la voie Akt, qui induit la phosphorylation de la protéine. Enfin, les niveaux de la protéine Beclin-1 diminuent (**Table 4**), suggérant là aussi une voie mTOR-indépendante de régulation de ses niveaux protéiques (**Figure 41**).

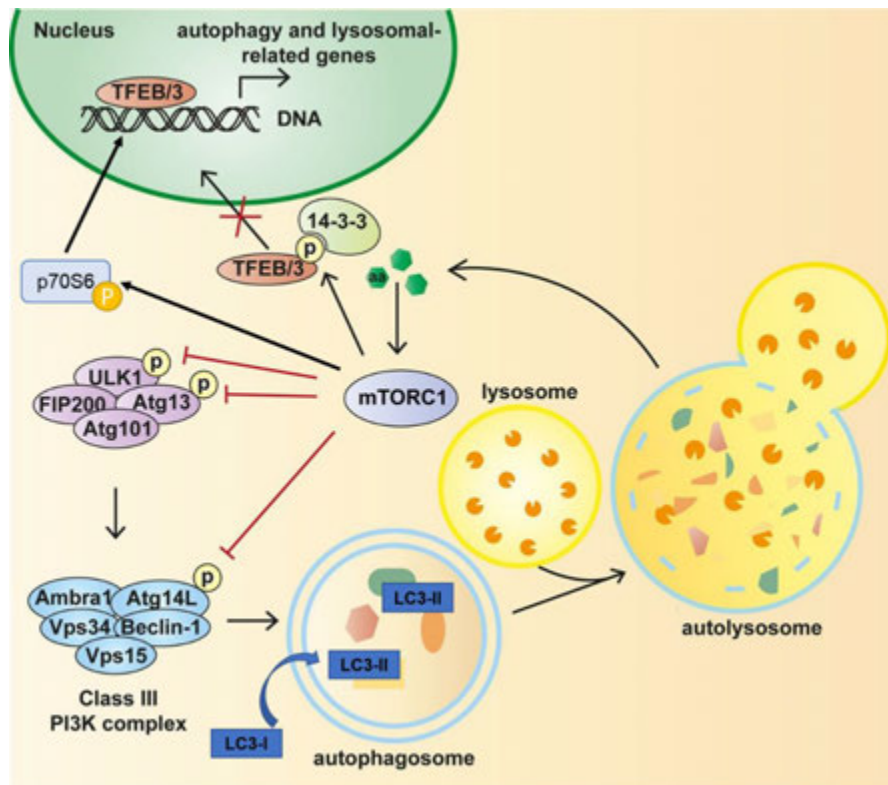


Figure 41: Voies de signalisation mTOR-dépendante de l'autophagie. Adapté de (Rabanal-Ruiz *et al.*, Essays In Biochemistry, 2017)

6. Conclusion :

Les premières analyses biochimiques de marqueurs autophagiques présentées dans cette étude confirment une altération de l'activité autophagique dans le cerveau de patients atteints d'AMS. Des analyses ultérieures avec d'autres marqueurs autophagiques complémentaires sont nécessaires pour identifier les potentielles voies mTOR-indépendante impliquées, et également différencier les altérations de la voie macroautophagique et celles de l'autophagie médiée par les protéines chaperons.

Projet 6 : Cibler la surexpression du facteur de transcription EB comme stratégie thérapeutique commune aux synucléinopathies

Transcription factor EB overexpression prevents neurodegeneration in experimental synucléinopathies

Auteurs: Marie-Laure Arotcarena^{1,2,8}, Mathieu Bourdenx^{1,2,8,§}, Nathalie Dutheil^{1,2}, Marie-Laure Thiolat^{1,2}, Evelyne Doudnikoff^{1,2}, Sandra Dovero^{1,2}, Andrea Ballabio^{3,4,5}, Pierre-Olivier Fernagut⁶, Wassilios G Meissner^{1,2,7}, Erwan Bezard^{1,2}, and Benjamin Dehay^{1,2#}

⁸ Ces auteurs ont contribué de manière équivalente à ce travail.

JCI Insight (Accepté)

Comme décrit dans la troisième partie de l'introduction, la dégradation de l' α -syn est assurée en partie par la voie autophagique, notamment par la macroautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperons. Une altération de la voie autophagique est observée dans les cerveaux des patients atteints de synucléinopathie et contribue à l'agrégation et la propagation de l' α -syn mais également au phénomène neurodégénératif. Une induction de la voie macroautophagique s'avère donc une stratégie thérapeutique pertinente pour les synucléinopathies dans le but de maintenir les niveaux physiologiques de la protéine α -syn en augmentant sa dégradation. (**Arotcarena et al., Cells, 2019**)

Dans cette optique, nous avons choisi de cibler l'expression du facteur de transcription EB (TFEB). Le facteur de transcription TFEB a été découvert en 2009 avec un rôle clé sur la machinerie autophagique, régulant la biogénèse lysosomale à travers la voie de signalisation CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation) (**Sardiello et al., Science, 2009, Septembre & Ballabio, Autophagy, 2011, Settembre et al., Science (New York, NY), 2011**). A la suite d'une surexpression de TFEB dans les neurones dopaminergiques d'un modèle rat de la maladie de Parkinson exprimant l' α -syn humaine sauvage dans la substance noire, il a pu être démontré une atténuation des déficits moteurs et de la neurodégénérescence induits par l' α -syn (**Decressac et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2013**). Cette neuroprotection a été associée à une augmentation de la clairance de la protéine après induction de la voie autophagique (**Decressac et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2013**). Le rôle direct de TFEB dans la dégradation lysosomale de l' α -syn a été démontré dans un modèle génétique et chimique d'induction de TFEB *in vitro* (**Kilpatrick et al., PLoS One, 2015**). Enfin, récemment, une équipe a démontré l'implication de TFEB dans des processus neurotrophiques, démontrant que la surexpression neuronale de TFEB dans un modèle murin de la maladie de Parkinson induit par la neurotoxine MPTP, entraîne une activation des

voies de synthèse protéique et de croissance cellulaire telles que les voies Akt et MAPK1/3 et leurs effecteurs 4E-BP1 et S6K1. (Torra *et al.*, *Mol Ther*, 2018).

Dans cet article, nous avons d'abord voulu confirmer l'effet neuroprotecteur de TFEB dans un autre modèle pertinent de la maladie de Parkinson, le modèle rat surexprimant l' α -syn humaine mutée A53T dans la substance noire. Cette première étape nous a permis de corroborer les résultats publiés dans un modèle animal de MP différent en montrant une restauration complète des déficits moteurs, associée à une neuroprotection nigro-striée et une augmentation de la clairance de l' α -syn pathogénique dans la substance noire après surexpression de TFEB dans les neurones dopaminergiques de ce modèle rongeur de la maladie de Parkinson.

Nous nous sommes ensuite intéressés à savoir si cette stratégie pouvait être pertinente et transposable à une autre synucléinopathie telle que l'AMS pour laquelle l'altération autophagique est également avérée. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié en post-mortem les niveaux nucléaires et cytosoliques de la protéine TFEB dans le putamen et le cortex frontal de patients atteints d'AMS-parkinsonien, comparé aux individus sains. Nous avons montré une diminution du ratio TFEB nucléaire / TFEB cytosolique suggérant un déficit de localisation nucléaire de TFEB, localisation essentielle à ce facteur de transcription pour y réguler l'expression génique. Nous nous sommes alors consacrés à l'étude d'un potentiel rôle thérapeutique d'une surexpression de TFEB sur un modèle murin de l'AMS. L'AMS étant une synucléinopathie particulière du fait de la présence des corps d'inclusions positifs pour l' α -syn spécifiquement dans les oligodendrocytes, associée à une perte neuronale, le choix du type cellulaire à cibler pour la surexpression de TFEB s'est posé. Nous avons choisi d'y répondre en produisant deux vecteurs viraux afin d'exprimer spécifiquement TFEB soit dans les neurones ou soit dans les oligodendrocytes de la substance noire d'un modèle murin d'AMS. Nous avons ainsi démontré qu'une surexpression neuronale de TFEB n'induit aucune neuroprotection ni d'effet sur la synucléinopathie, malgré un effet neurotrophique avéré et la confirmation de l'induction autophagique dans les neurones dans notre modèle murin d'AMS. Au contraire, cibler la surexpression de TFEB dans les oligodendrocytes entraîne des effets neuroprotecteurs et neurotrophiques dans la voie nigro-striée, associés à une diminution des niveaux d' α -syn nigraux après induction de l'autophagie oligodendrogliale.

En conclusion, nous avons confirmé l'intérêt d'une surexpression neuronale de TFEB dans un autre modèle de la maladie de Parkinson, ce qui démontre le potentiel de cette stratégie thérapeutique. Nous avons ensuite étayé l'intérêt thérapeutique de cibler TFEB en démontrant pour

la première fois qu'un ciblage cellulaire spécifique de la surexpression de TFEB dans les oligodendrocytes s'avère une stratégie payante pour induire un effet neuroprotecteur dans un modèle murin d'atrophie multisystématisée. Cet article met également en lumière la pertinence de l'induction de l'autophagie comme stratégie thérapeutique commune pour toutes les synucléinopathies. Une telle stratégie peut être induite par diverses approches utilisant différents acteurs de la voie autophagique mais nécessite de cibler les cellules contenant les corps d'inclusions positifs pour l' α -syn pour garantir d'une efficacité thérapeutique.

Transcription factor EB overexpression prevents neurodegeneration in experimental synucleinopathies

Marie-Laure Arotcarena, ... , Erwan Bezard, Benjamin Dehay

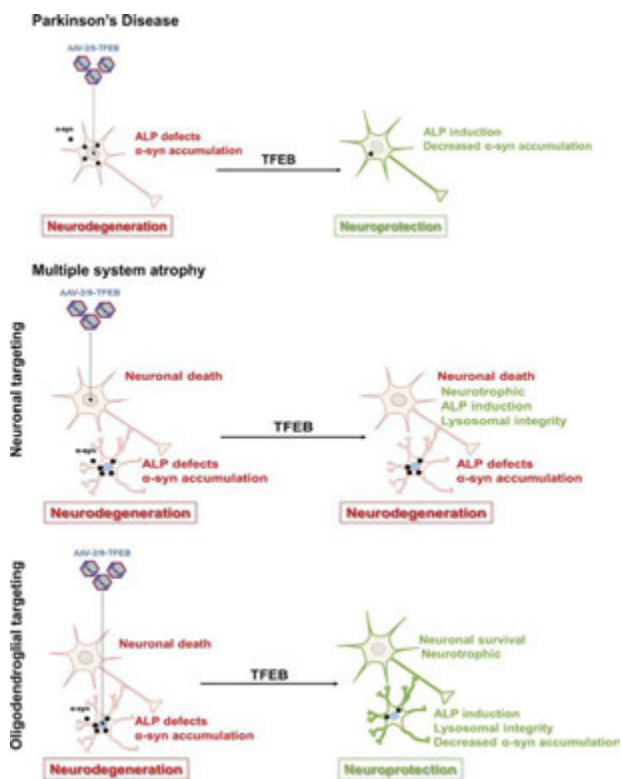
JCI Insight. 2019;4(16):e129719. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129719>.

Research Article

Neuroscience

Therapeutics

Graphical abstract



Find the latest version:

<http://jci.me/129719/pdf>



Transcription factor EB overexpression prevents neurodegeneration in experimental synucleinopathies

Marie-Laure Arotcarena,^{1,2} Mathieu Bourdenx,^{1,2} Nathalie Dutheil,^{1,2} Marie-Laure Thiolat,^{1,2} Evelyne Doudnikoff,^{1,2} Sandra Dovero,^{1,2} Andrea Ballabio,^{3,4,5} Pierre-Olivier Fernagut,⁶ Wassilios G. Meissner,^{1,2,7} Erwan Bezard,^{1,2} and Benjamin Dehay^{1,2}

¹Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France. ²CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France. ³Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (Naples), Italy. ⁴Department of Translational Medicine, Federico II University, Naples, Italy. ⁵Department of Molecular and Human Genetics, Ian and Dan Duncan Neurological Research Institute, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA. ⁶Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, INSERM U-1084, Université de Poitiers, Poitiers, France. ⁷Service de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France.

The synucleinopathies Parkinson's disease (PD) and Multiple system atrophy (MSA) – characterized by α -synuclein intracytoplasmic inclusions into, respectively, neurons and oligodendrocytes – are associated with impairment of the autophagy-lysosomal pathways (ALP). Increased expression of the master regulator of ALP, transcription factor EB (TFEB), is hypothesized to promote the clearance of WT α -synuclein and survival of dopaminergic neurons. Here, we explore the efficacy of targeted TFEB overexpression either in neurons or oligodendrocytes to reduce the pathological burden of α -synuclein in a PD rat model and a MSA mouse model. While TFEB neuronal expression was sufficient to prevent neurodegeneration in the PD model, we show that only TFEB oligodendroglial overexpression leads to neuroprotective effects in the MSA model. These beneficial effects were associated with a decreased accumulation of α -synuclein into oligodendrocytes through recovery of the ALP machinery. Our study demonstrates that the cell type where α -synuclein aggregates dictates the target of TFEB overexpression in order to be protective, paving the way for adapted therapies.

Authorship note: MLA and MB contributed equally to this work.

Conflict of interest: EB is a director and a shareholder of Motac Holdings Ltd.

Copyright: © 2019 Arotcarena et al. This is an open access article published under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Submitted: April 22, 2019

Accepted: July 11, 2019

Published: August 22, 2019.

Reference information: *JCI Insight*. 2019;4(16):e129719. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129719>.

2019;4(16):e129719.

<https://doi.org/10.1172/jci.insight.129719>.

insight.129719.

Introduction

Synucleinopathies are a heterogeneous group of neurodegenerative diseases characterized by the formation of α -synuclein (α -syn) aggregates. Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease and is characterized by motor and nonmotor symptoms. The motor symptomatology is mainly associated with profound dopamine depletion in the striatum due to the loss of mesencephalic dopaminergic neurons. The main neuropathological hallmark of PD is the presence of neuronal α -syn-positive intracytoplasmic inclusions named Lewy bodies (LB) in cell bodies and Lewy neurites in cell processes (1). Multiple system atrophy (MSA) is a rare, fast-progressing disease divided in 2 clinical phenotypes: (a) the MSA parkinsonian showing L-3,4-dihydroxyphenylalanine nonresponsive parkinsonian syndrome with bradykinesia, rigidity, and rest tremor due to a dopaminergic loss in the nigrostriatal pathway; and (b) the MSA cerebellar exhibiting cerebellar syndrome with gait, speech, and limb ataxia, and cerebellar oculomotor dysfunction caused by a neuronal loss in the olivopontocerebellar pathway. The neuropathological hallmark of MSA is the presence of α -syn-positive cytoplasmic inclusions, in oligodendrocytes, named glial cytoplasmic inclusions (2).

The presence of α -syn-positive aggregates suggests that a defect in α -syn degradation could play a role in the accumulation of the aggregated and misfolded proteins in these neurodegenerative disorders (3, 4). α -Syn degradation is ensured by the 2 protein degradation pathways: the ubiquitin-proteasome system (5) and the autophagy-lysosomal pathways (ALP) through both macroautophagy and chaperone-mediated autophagy (6–9). The ALP is a versatile cellular proteolytic system allowing the degradation of long-lived protein, protein aggregates, and abnormal organelles — among other cellular waste — through different mechanisms (10).

Macroautophagy allows degradation after the formation and fusion of cargo-vesicles called autophagosomes carrying the material with lysosomes containing enzymatic material (10). Chaperone-mediated autophagy is a selective pathway allowing the degradation of protein after recognition of pentapeptide (KFERQ-like motif) by the cytosolic chaperone heat-shock cognate 70 kDa protein and delivery to the lysosome. Genetic and neuropathological evidence suggest that ALP defects are involved in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. Relevant to synucleinopathies, several lines of evidence suggest that the assembly state of α -syn can affect the degradation machinery. In particular, monomeric and small soluble oligomeric forms of α -syn are degraded through the ubiquitin-proteasome system or chaperone-mediated autophagy, whereas larger oligomeric or aggregated forms are cleared by macroautophagy (11, 12).

Similar to PD, impairment of the ALP occurs in MSA. Postmortem studies showed that the microtubule-associated protein 1 light chain 3 β (LC3B) autophagosome marker is increased and present within glial cytoplasmic inclusions in brains of MSA patients (13–15). Recently, it has also been demonstrated that the ALP is impaired in induced pluripotent stem cells–derived dopaminergic neurons from MSA patients, with decreased autophagic flux leading to further accumulation of nondegraded autophagosomes (16). Thus, defects in the ALP might be involved in the accumulation of α -syn in oligodendrocytes contributing to neurodegeneration in MSA. Enhancing ALP, thus, appears as a putative attractive approach for preventing accumulation of α -syn in synucleinopathies (10).

Transcription factor EB (TFEB) has emerged as a master activator of the autophagy machinery, as it regulates the expression of lysosomal genes through the Coordinated Lysosomal Expression and Regulation (CLEAR) signaling network, enhancing both lysosomal biogenesis and autophagy (17–22). In the context of PD, overexpression of TFEB has been shown to attenuate dopaminergic cell death and motor deficits induced by adeno-associated virus–mediated (AAV-mediated) overexpression of WT α -syn in rats through autophagy enhancement (23). Moreover, the important role of TFEB in the lysosomal-associated α -syn clearance has been elucidated in a genetic and chemical activation model of TFEB in vitro (24, 25). Recently, it has been also reported that overexpression of TFEB in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine–intoxicated (MPTP-intoxicated) mice induces neurotrophic effects — in addition to its neuroprotective effects on dopaminergic neurons (26). Here, we investigate whether cell-specific induction of the ALP through AAV-mediated TFEB overexpression may exert beneficial effects in a viral-based rat model of PD and in the transgenic PLP α -syn mouse model of MSA by targeting cellular-specific overexpression of TFEB.

Results

TFEB overexpression induces neuroprotection in the A53T- α -Syn rat model of PD. Since TFEB overexpression has been shown to be neuroprotective against AAV-mediated WT α -syn overexpression in rats (23), we first aimed at extending this observation through the assessment of the effects of increasing the ALP through TFEB overexpression in a rat model of PD based, this time, on the overexpression of human mutated A53T- α -syn. We used 2 AAV pseudotype 2/9 to deliver either human A53T- α -syn under the human synapsin-1 promoter with the cytomegalovirus (CMV) enhancer (CMVie/hSyn; AAV2/9-CMVie/hSyn-A53T- α -Syn) or 3 \times Flag-tagged murine TFEB (AAV2/9-CMV-mTFEB-3 \times Flag) under the CMV promoter. Both viruses were coinjected unilaterally in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Four months after surgery, we validated that both viruses allowed expression of their respective transgenes in dopaminergic neurons, identified by tyrosine-hydroxylase (TH) immunostaining (Supplemental Figure 1, A–C; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129719DS1>).

Four months after stereotactic surgery, we observed that coinjection of AAV-TFEB and AAV-A53T- α -syn was able to prevent behavioral impairments induced in this model of PD (Figure 1, A and B, and ref. 27). Indeed, TFEB overexpression maintained the use of the paw contralateral to the lesion in the cylinder test ($F_{[3,26]} = 15.71$, $P < 0.0001$) and significantly decreased amphetamine-induced rotation ($F_{[3,24]} = 6.733$, $P = 0.0019$). Immunohistological investigations revealed that the dopaminergic nigrostriatal tract was preserved when TFEB was coexpressed with mutated α -syn at both striatal dopaminergic terminals (Figure 1C; $F_{[3,23]} = 21.07$, $P < 0.0001$) and SNpc dopaminergic neurons (Figure 1C; $F_{[3,23]} = 12.83$, $P < 0.0001$) levels.

Further investigations showed that TFEB overexpression significantly decreased the pathological burden of α -syn with (a) a reduction of human mutated α -syn accumulation (Figure 1D; ~50% reduction; [$F_{(3,8)} = 50.6$, $P < 0.0001$]), (b) a dramatic decrease in pathological Serine129 phosphorylated α -syn (pS129- α -syn) staining levels in the SNpc (Figure 1E), and (c) a dampening of the induced astrogliosis in the SN (Supplemental Figure 1D). Altogether, these results both confirm and extend the

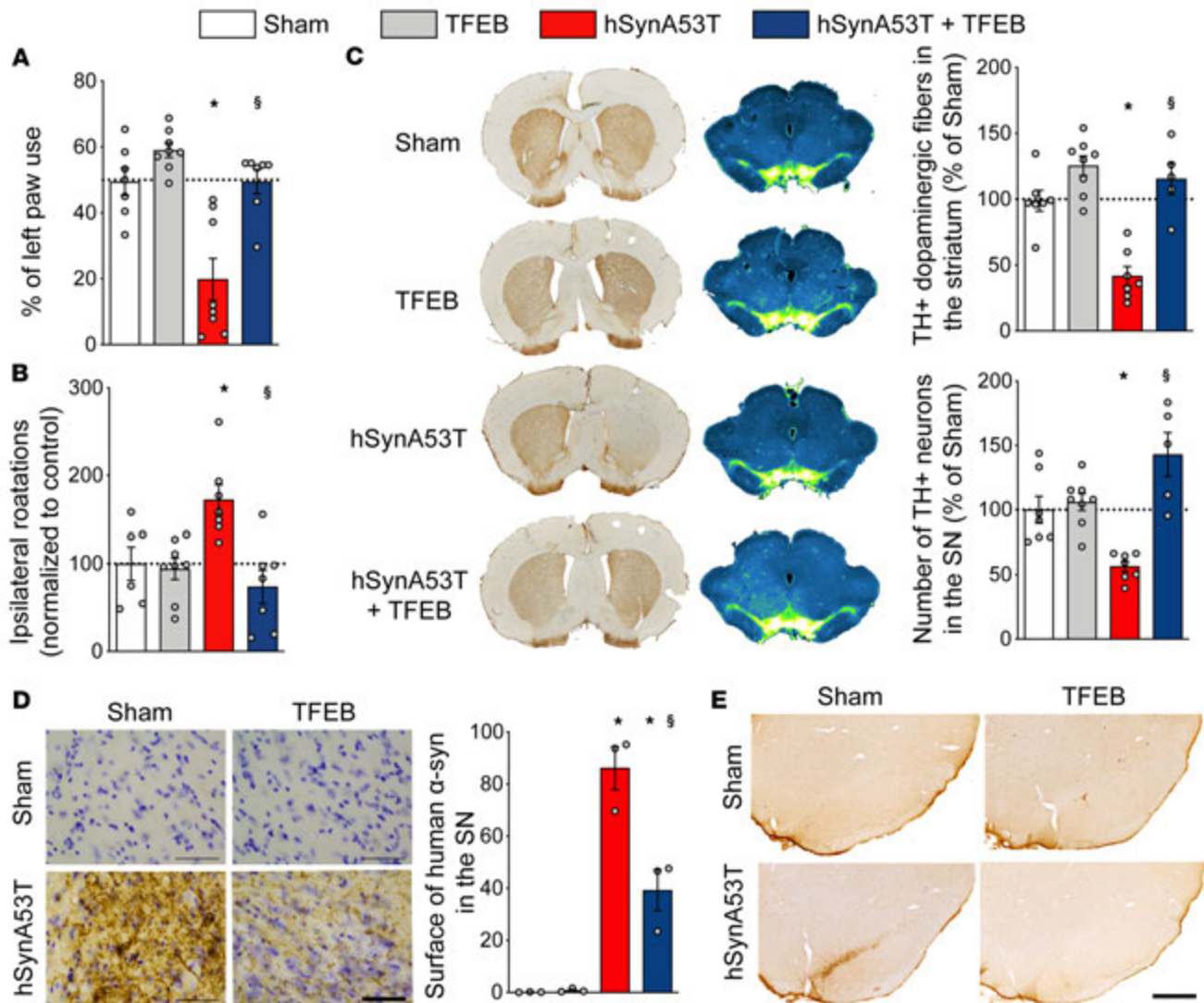


Figure 1. TFEB overexpression prevents mutant A53T- α -syn toxicity in a rat model of Parkinson's disease. (A) TFEB overexpression restores the use of left paw in the cylinder test. (B) TFEB overexpression alleviates amphetamine-induced rotation behavior (1 mg/kg). (C) TFEB overexpression prevents α -syn-induced dopaminergic degeneration. Left lane and upper plot: representative images and quantification of striatal tyrosine hydroxylase (TH) staining. Right lane and lower plot: representative images of mesencephalic section of TH staining and stereological counting of TH-positive cells in the substantia nigra (SN). Inverted green fire blue lookup table was used to enhance visualization of the lesion. (D) Representative images and surface quantification of human α -syn staining in the SN. Scale bar: 50 μ m. (E) Representative images of Serine129-phosphorylated α -syn in the SN. Scale bar: 500 μ m. Data represent mean \pm SEM. Comparisons were made using 1-way ANOVA and Bonferroni's correction for multiple comparison, $n = 7-8$ per group. * $P < 0.05$ vs. sham-injected animals. $^{\S}P < 0.05$ vs. hSynA53T-injected animals.

proposal that overexpression of TFEB might be beneficial in experimental PD and also validate our TFEB transgene.

Levels of TFEB are decreased in MSA patient brains. Impaired TFEB function has been previously reported in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (28) and PD (23), but its potential impairment in MSA is still unknown. We thus determined whether defects in TFEB may also occur in MSA patients (Supplemental Table 1). Being a transcription factor, we investigated the subcellular localization of TFEB. We measured protein expression levels of TFEB in nuclear and cytosolic fractions from frontal cortex and putamen lysates of healthy individuals and MSA patients. We observed that TFEB protein levels were significantly reduced in the nuclear fractions in the putamen of MSA patients compared with healthy individuals (Figure 2, A and B, $P = 0.037$) and, to a lesser extent, in the frontal cortex (Figure 2, C and D), a brain region less affected in MSA parkinsonian cases. These observations suggest a defect in TFEB nuclear

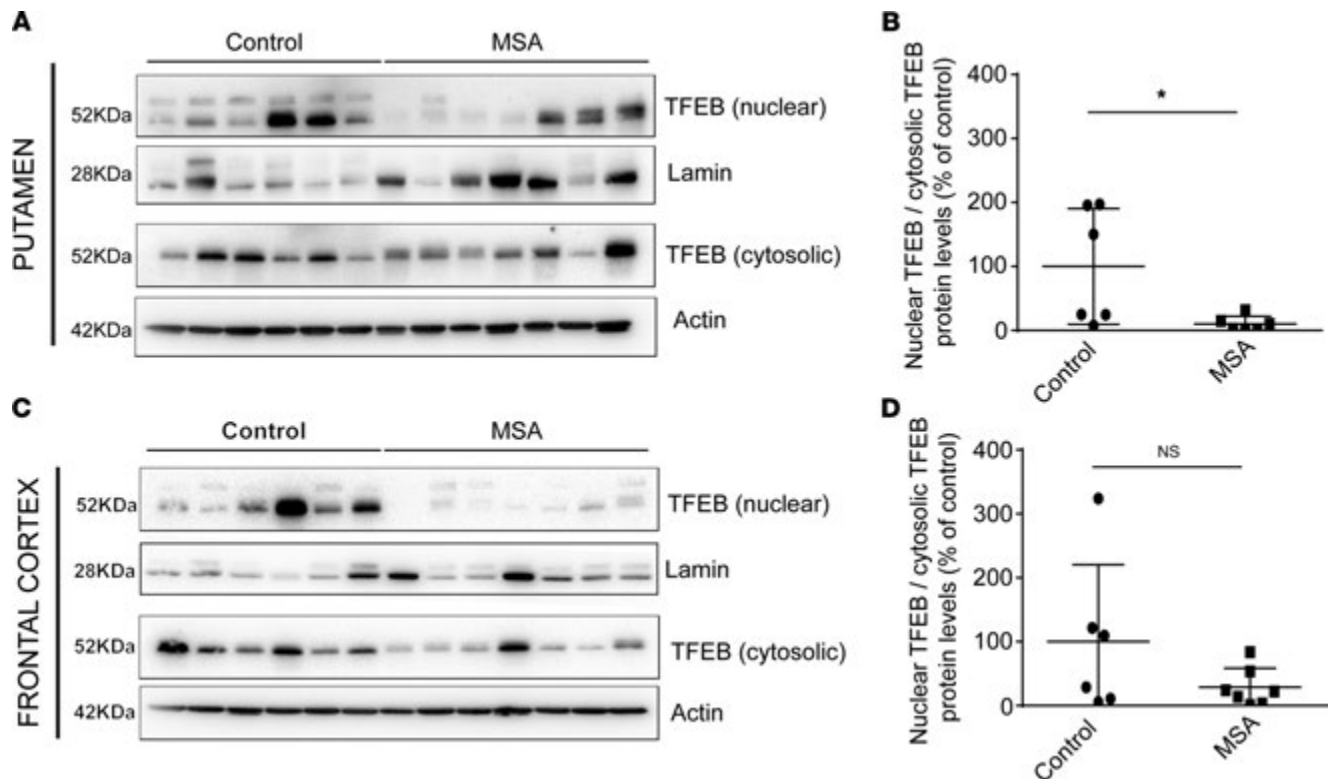


Figure 2. Reduced TFEB protein expression in MSA nuclear fractions in putamen and frontal cortex. (A and B) Representative immunoblot levels of TFEB in nuclear and cytosolic fractions from putamen of healthy individuals ($n = 6$) and MSA patients ($n = 7$). (C and D) TFEB immunoblot levels in nuclear and the cytosolic fractions from frontal cortex of age-matched healthy individuals and MSA patients. The term nuclear TFEB corresponds to the measured TFEB protein levels into the nuclear fraction normalized by Lamin protein levels. The term cytosolic TFEB corresponds to the measured TFEB protein levels into the cytosolic fraction normalized by Actin protein levels. The ratio of nuclear TFEB divided by cytosolic TFEB is then presented on the graph for each region. Data represent mean \pm SEM. Comparisons were made using nonparametric *t* test. * $P < 0.05$ compared with healthy individuals.

translocation associated with a possible reduction in TFEB transcriptional activity, similar to other neurodegenerative diseases.

Sustainable cell-specific expression of exogenous TFEB in the SN of PLP mice. To address the therapeutic potential of restoring TFEB levels in a clinically relevant mouse model of MSA, we aimed at overexpressing TFEB in a transgenic mouse model of MSA expressing human WT α -syn under the control of the oligodendrocyte-specific promoter PLP (hereafter referred as PLP mice) (29–33). In the PD-relevant experiments, human α -syn was expressed in SNpc neurons. In the MSA-relevant experiments, we compared the effects of neuronal vs. oligodendroglial TFEB overexpression. To this end, we employed the CMVie/hSyn promoter to drive neuron-specific expression of HA-tagged mTFEB (CMVie/hSyn-mTFEB-HA) and the myelin basic protein (MBP) promoter for oligodendrocyte-specific expression of 3 \times Flag-tagged mTFEB (MBP-mTFEB-3 \times Flag). To validate and determine the protein expression level of exogenous TFEB, we transiently expressed the 2 constructs in HEK293T cell lines and performed immunoblotting against TFEB, HA, and Flag (Figure 3, A and B). Transfected cells exhibited over 2-fold increase for each cell type-specific promoter with similar levels of expression between the 2 promoters (Figure 3, A and B).

AAV2/9-mediated transgene expression was then evaluated *in vivo* 5 months after intranigral injection in WT and PLP mice (Figure 3, C–F, and Supplemental Figure 2). Under the CMVie/hSyn promoter, TFEB expression was identified in the cytoplasm and the nucleus of nigral TH-positive dopaminergic cells (Figure 3C), confirming neuronal expression. After 5 months, TFEB protein levels were increased by 10-fold in comparison with control mice for CMVie/hSyn-mTFEB-HA-injected mice (Figure 3D). Likewise, viral vectors expressing TFEB under the MBP promoter showed transgene expression into the cytoplasm and the nucleus of nigral oligodendrocytes (Figure 3E) and 1.5-fold increase in MBP-mTFEB-3 \times Flag-injected mice (Figure 3F). We thus were able to drive the overexpression of TFEB in the SN of WT and PLP mice in a cell-specific manner. The nuclear localization of exogenous TFEB either in neurons or

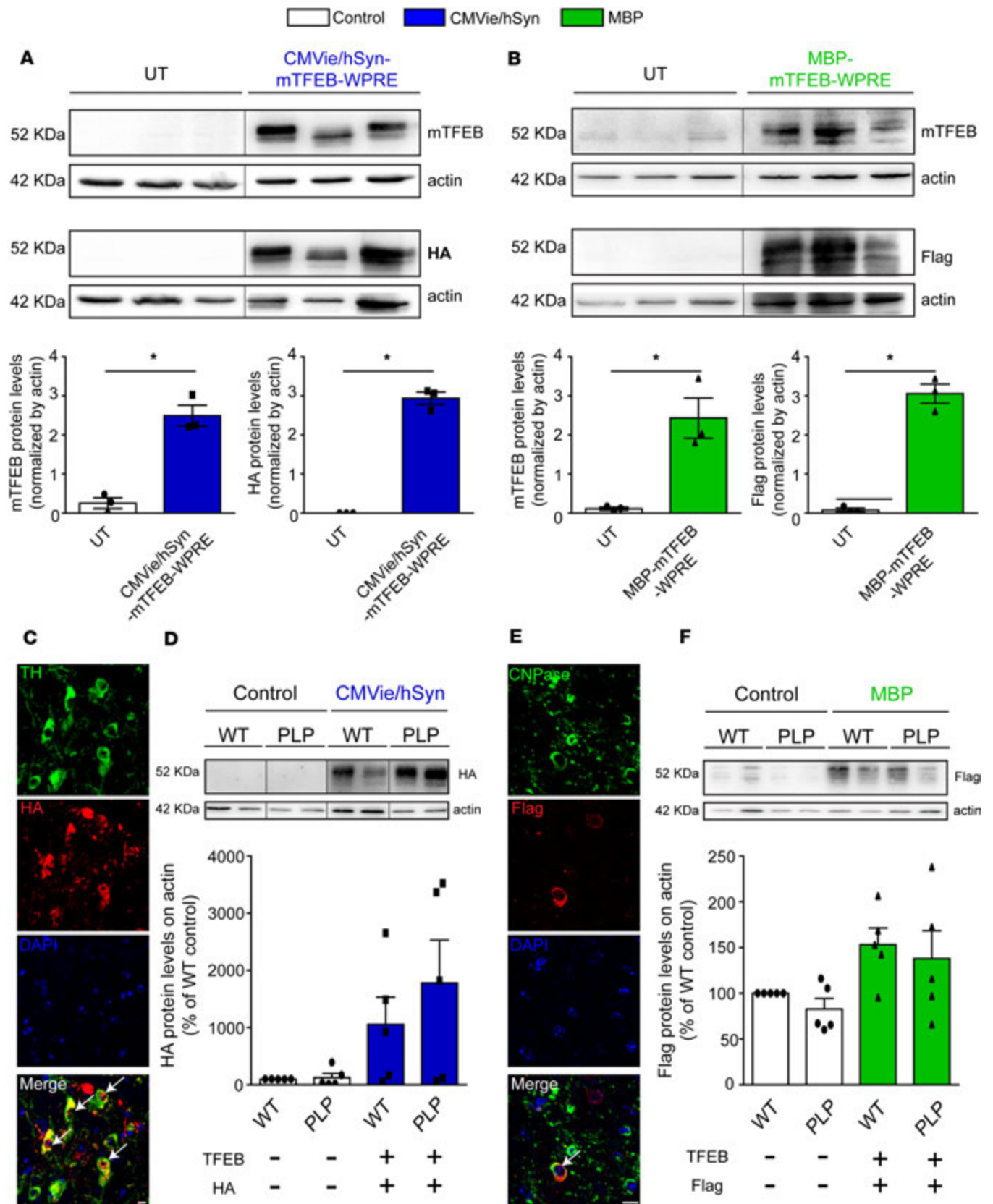


Figure 3. Sustainable TFEB transgene expression in vitro and in vivo. (A) Representative images (top) and quantification (bottom) of TFEB and HA tag immunoblotting in HEK293T cells transfected for 48 hours with the mTFEB-expressed plasmid under the neuronal CMVie/Synapsin promoter (CMVie/Synapsin-mTFEB-HA-WPRE). (B) Representative images (top) and quantification (bottom) of TFEB and Flag tag immunoblotting in HEK293T cells transfected for 48 hours with the mTFEB-expressed plasmid under the oligodendroglial promoter MBP (MBP-mTFEB-3×Flag-WPRE). Data represent mean ± SEM. Comparisons were made using nonparametric *t* test. **P* < 0.05 compared with nontransfected cells. (C) Confocal images using HA tag and tyrosine hydroxylase (TH) antibodies in the ipsilateral SN of mice injected with the CMVie/Synapsin-mTFEB-HA virus 5 months after the injection. The white arrows indicate the presence of HA-tagged mTFEB signal into the nucleus of TH-positive neurons. Scale bar: 10 μm. (D) Representative images (top) and quantification (bottom) of HA tag immunoblotting in the ipsilateral SN of CMVie/Synapsin-mTFEB-HA-injected WT and PLP mice 5 months after the injection. *n* = 5 per group. Data represent mean ± SEM. Comparisons were made using 1-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. White bars, control; blue bars, CMVie/Synapsin-mTFEB-HA. (E) Confocal images using Flag tag and CNPase antibodies in the ipsilateral SN of mice injected with the MBP-mTFEB-3×Flag virus 5 months after the injection. The white arrow indicates the presence of Flag tag signals into the nucleus of CNPase-positive oligodendrocytes. Scale bar: 10 μm. (F) Representative images (top) and quantification (bottom) of Flag tag immunoblotting in the ipsilateral SN of MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice 5 months after the injection. Data represent mean ± SEM. Comparisons were made using 1-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. White bars, control; green bars, MBP-mTFEB-3×Flag. In A, B, D, and F, lanes were run on the same gel but were noncontiguous.

in oligodendrocytes demonstrated the long-term expression level in AAV-mTFEB-transduced cells and the efficiency of TFEB to be translocated to the nucleus to exert its transcriptional activity (34, 35).

Oligodendroglial-targeted TFEB overexpression rescues dopaminergic neurodegeneration in PLP mice. Next, we hypothesized that cell type-specific expression of TFEB would differentially protect against neurodegeneration in PLP mice. As previously reported (29–33), noninjected control PLP mice displayed an approximately 30% loss of SN dopaminergic cells, as determined by stereological counting of SN TH- and Nissl-positive cells (Figure 4, A and B; $F_{[1,29]} = 30.52$, *P* = 0.0017) and a 15% loss of striatal dopaminergic terminals, as assessed by measurement of the optical density of TH-positive staining (Figure 4, C and D).

Interestingly, neuronal expression of TFEB in PLP mice did not afford neuroprotection, as we observed similar dopaminergic neurodegeneration both at the level of SN cell bodies and striatal terminals, compared with control mice (Figure 4, A–D). In contrast, oligodendroglial-targeted expression of TFEB attenuated neurodegeneration compared with neuronal-targeted TFEB in PLP mice, both at the level of SN dopaminergic neuron cell bodies and striatal dopaminergic neurons (Figure 4, A–D). Overall, these data indicated that only oligodendroglial-targeted TFEB overexpression can prevent nigrostriatal neurodegeneration in the PLP mouse model of MSA.

Overexpression of TFEB in oligodendrocytes modestly prevents α-syn accumulation in the nigrostriatal pathway of PLP mice. We next determined whether the neuroprotection associated with TFEB expression observed in PLP mice was also accompanied by a reduction of markers of synucleinopathy (i.e., our hypothesized primary target for enhanced ALP). We examined the effects of TFEB overexpression on α-syn species identified by a human-specific α-syn antibody in the absence or presence of proteinase K (PK) pretreatment (Figure 5A). PK treatment reveals the accumulation of misfolded PK-resistant α-syn aggregates, as reported in this transgenic PLP α-syn mouse model of MSA (29–33). Without PK treatment, no significant differences were observed regarding the number of α-syn-positive dots per μm² counted by stereology in the SN of injected PLP mice compared with control PLP animals (Figure 5B). Following PK digestion, however, AAV-MBP-mTFEB-injected PLP mice exhibited a marked reduction of PK-resistant aggregates in the SN compared with control mice (Figure 5C). However, no significant differences were observed in α-syn staining in the striatum in the 3 experimental groups (Figure 5, E and F).

To further characterize the effect of TFEB regarding α-syn pathology, we performed immunohistochemical investigations in the SN and the striatum with a phospho-specific Serine129 α-syn (pS129-α-syn) antibody used as a second indicator of pathological α-syn (Figure 5, A and E). We observed an increase in the number of pS129 α-syn dots per μm² in the SN of the CMVie/hSyn-mTFEB PLP mice compared with control PLP mice (Figure 5D). No significant differences were observed regarding pS129-α-syn immunostaining in the striatum (Figure 5G). Our results indicate that only oligodendroglial-targeted TFEB overexpression modestly reduces the burden of α-syn pathology, through the pathological PK-resistant species of α-syn, whereas neuronal-targeted TFEB had no effect or rather enhanced the accumulation of pS129-α-syn.

Oligodendroglial TFEB-mediated neuroprotection is independent of astrogliosis and microgliosis in PLP mice. Given the importance of the astroglial and microglial reaction in neurodegeneration, we next assessed the extent of astrogliosis and microgliosis using glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) immunostaining, respectively. No significant differences were observed between the 3 experimental groups regarding GFAP immunoreactivity in the SN (Figure 6, A and B). At the striatal level, we obtained a significant astrogliosis between PLP and WT mice, which was reduced in the CMVie/hSyn-mTFEB

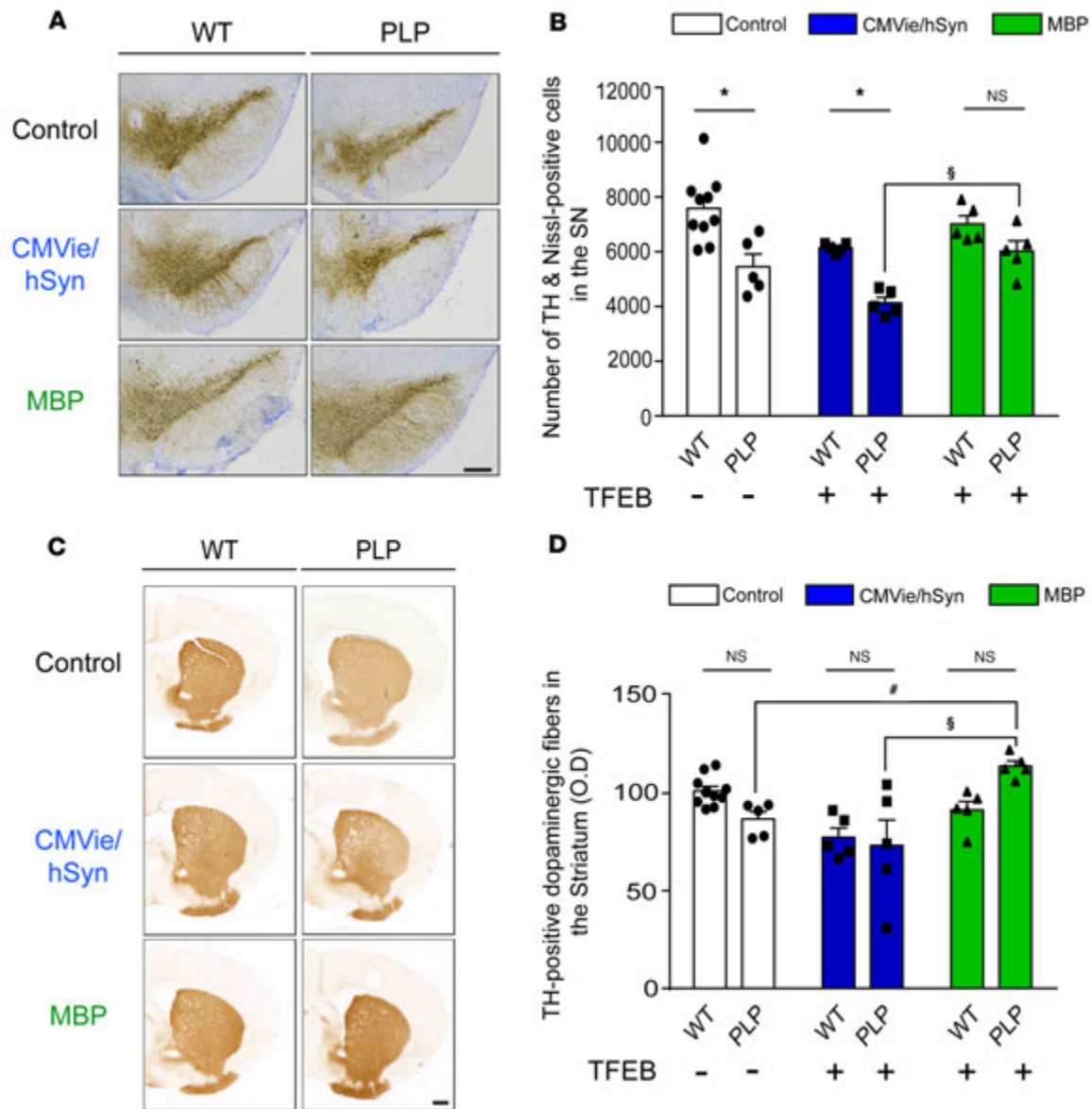


Figure 4. Specific oligodendroglial TFEB-targeted overexpression attenuates dopaminergic neurodegeneration in a MSA mouse model. (A) Representative images of TH staining in the SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. Scale bar: 500 μ m. (B) Number of TH- and Nissl-positive neurons counted by stereology in the SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. (C) Representative images of TH staining into the striatum of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. Scale bar: 500 μ m. (D) Dot plot of mean gray-scale values of striatal TH immunoreactivity measured by optical density in the striatum of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. $n = 5$ per group. White bars, control; blue bars, CMVie/hSyn-mTFEB-HA; green bars, MBP-mTFEB-3 \times Flag. Data represent mean \pm SEM. Comparisons were made using 2-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. * $P < 0.05$ compared with WT mice. # $P < 0.05$ compared with PLP control mice. $^{\S}P < 0.05$ compared with CMVie/hSyn-mTFEB injected PLP mice.

group, suggesting a decrease in astrogliosis following neuronal expression of TFEB (Figure 6, C and D), reminiscent of what we observed in the A53T- α -syn rat model of PD (Supplemental Figure 1D). Regarding microglia proliferation, no significant differences were observed in microglial Iba1 immunoreactivity in the SN (Figure 6, E and F) and in the striatum (Figure 6, G and H). These results suggest that targeted TFEB overexpression did not change the astrogliosis and microgliosis in the PLP mouse model of MSA.

TFEB expression induces neurotrophic effects. Since TFEB expression was previously associated with neurotrophic effects (26), we wondered whether the neuroprotective effects observed upon oligodendroglial expression of TFEB may be explained by neurotrophic support. As a proxy for branching, we quantified TH-positive immunoreactive staining in the SN, reflecting the surface occupied by both the dopaminergic

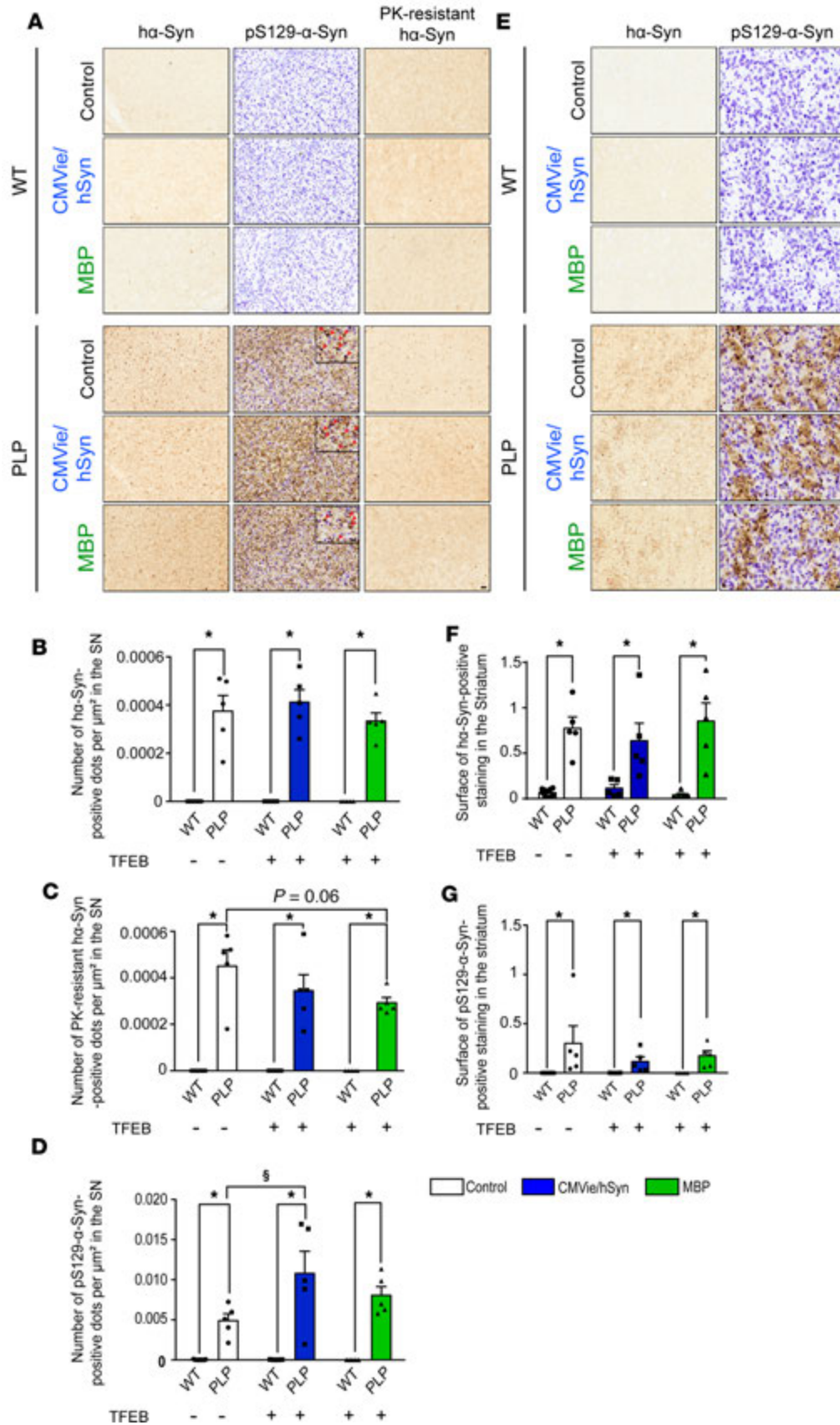


Figure 5. Oligodendroglial-targeted, but not neuronal TFEB-targeted, overexpression decreases the burden of aggregated forms of α -syn with no effect on phosphorylation at S129 in the nigrostriatal pathway of PLP mice. (A) Representative images of synucleinopathy in the SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. Left panel: α -syn staining using the human-specific α -syn LB509 antibody. Middle panel: Serine129-phosphorylated α -syn staining using the EP1536Y antibody. Right panel: α -syn staining using human-specific α -syn LB509 antibody after proteinase K treatment. Scale bars: 50 μ m; 20 μ m (inset, middle panel). The red arrowheads show the S129-positive α -syn dots in the SN. (B and C) Number of α -synuclein-positive dots per μ m² counted by stereology in the SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice without (B) and with (C) proteinase K treatment. (D) Number of Serine129-phosphorylated α -synuclein-positive dots per μ m² in the SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. (E) Representative images of synucleinopathy in the striatum of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. Left panel: α -syn staining using the human-specific α -syn LB509 antibody. Right panel: Serine129-phosphorylated α -syn staining using the EP1536Y antibody. Scale bar: 100 μ m. (F) Quantification of human α -syn LB509-positive immunostaining into the striatum of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. (G) Quantification of Serine129-phosphorylated α -syn-positive immunostaining in the striatum of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. $n = 5$ per group. White bars, control; blue bars, CMVie/hSyn-mTFEB-HA; green bars, MBP-mTFEB-3 \times Flag. Data represent mean \pm SEM. Comparisons were made using 2-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. * $P < 0.05$ compared with WT animals. ⁵ $P < 0.05$ compared with PLP control mice.

soma and the dopaminergic fibers. Overexpressing TFEB in either neurons or oligodendrocytes led to an increase of nigral TH immunoreactivity, suggesting a possible expansion of dopaminergic dendrites (Figure 7, A and B [$F_{(2,29)} = 11.95$; CMVie/hSyn-mTFEB PLP vs. control PLP, $P = 0.0367$; MBP-mTFEB PLP vs. control PLP, $P = 0.0673$]). We then confirmed this hypothesis in vitro by differentiating BE(2)-M17 human dopaminergic neuroblastoma cells with retinoic acid to induce a neuronal dendrite expansion phenotype (36) prior to transfection with the different TFEB-expressing plasmids. We observed that TFEB-transfected cells presented an increase in dendritic length measured by Simple Neural Tracer segmentation analysis, compared with nontransfected cells (Supplemental Figure 3, A and B; $F_{[2,239]} = 41.6$, $P < 0.0001$). These results confirmed that overexpression of TFEB in neuronal cells increases process length and confirms neurotrophic effect observed in vivo.

The PI3K/Akt pathway is a relevant signaling pathway for the mediation of neurotrophic activity (37). We thus measured the relative amount of Akt, as well as its Ser473-phosphorylated/activated form (P-Akt), by immunoblotting. The total amount of Akt protein was increased only when TFEB was overexpressed in oligodendrocytes ($F_{[2,24]} = 8.47$, $P = 0.012$), whereas no difference was observed for its phosphorylated form or for the ratio P-Akt/Akt (Supplemental Figure 3, C–F). These results indicated that oligodendroglial TFEB-mediated neurotrophic effects took place, at least in part, mediated through the regulation of Akt expression. No effect on the Akt signaling pathway was observed after neuronal-targeted TFEB expression, suggesting that the neurotrophic effect observed in this group was independent of the PI3K/Akt pathway activation.

Under basal WT and PLP mutant conditions, the number of TH- and Nissl-positive cells correlated with the surface of TH-positive immunostaining in the SN, suggesting that the PLP model showed dopaminergic neuronal soma and fiber loss in the SN (Figure 7C; $F_{[1,13]} = 5.45$, $P = 0.06$, $r^2 = 0.24$). Interestingly, the assessment of the relative contribution of TFEB-mediated neurotrophic (i.e., TH-positive immunostaining) vs. neuroprotective (i.e., number of TH- and Nissl-positive cells) in the SN revealed differential processes on the dopaminergic system according to the targeted cell type. Thus, overexpressing TFEB in oligodendrocytes led to both neuroprotective and neurotrophic effects (Figure 7, D and E; PLP control vs. MBP-mTFEB PLP mice), while neuronal overexpression of TFEB led only to neurotrophic effects, which were not sufficient to prevent neurodegeneration (Figure 7, D and E; PLP control vs. CMVie/hSyn-mTFEB PLP mice).

Neuronal and oligodendroglial-targeted TFEB induces the autophagic clearance machinery. Since TFEB is a master gene in the regulation of ALP (17–20, 22), we hypothesized that TFEB overexpression could lead to a recovery of the lysosomal machinery through lysosomal biogenesis and autophagy induction, which could enhance α -syn clearance. We first analyzed mRNA expression levels from SN patches showing that the *Tfeb* downstream target gene *Mcoln1* transcript expression is upregulated in MBP-mTFEB PLP-injected mice (Supplemental Figure 4A) associated with an upregulation of the autophagy-related *Tfeb* targets such as *Map1lc3a*, *Lamp2b*, *CtsB*, and *CtsF* genes (Supplemental Figure 4, B–E), suggesting a positive regulation of autophagy/lysosomal genes. Regarding neuronal TFEB overexpression, we were not able to detect any mRNA levels changes, probably due to a stronger neuronal cell death observed in this group (Figure 4).

Because alteration of lysosomal integrity, and lysosomal membrane permeabilization especially, have been described in synucleinopathies (38, 39), we next explored whether overexpression of

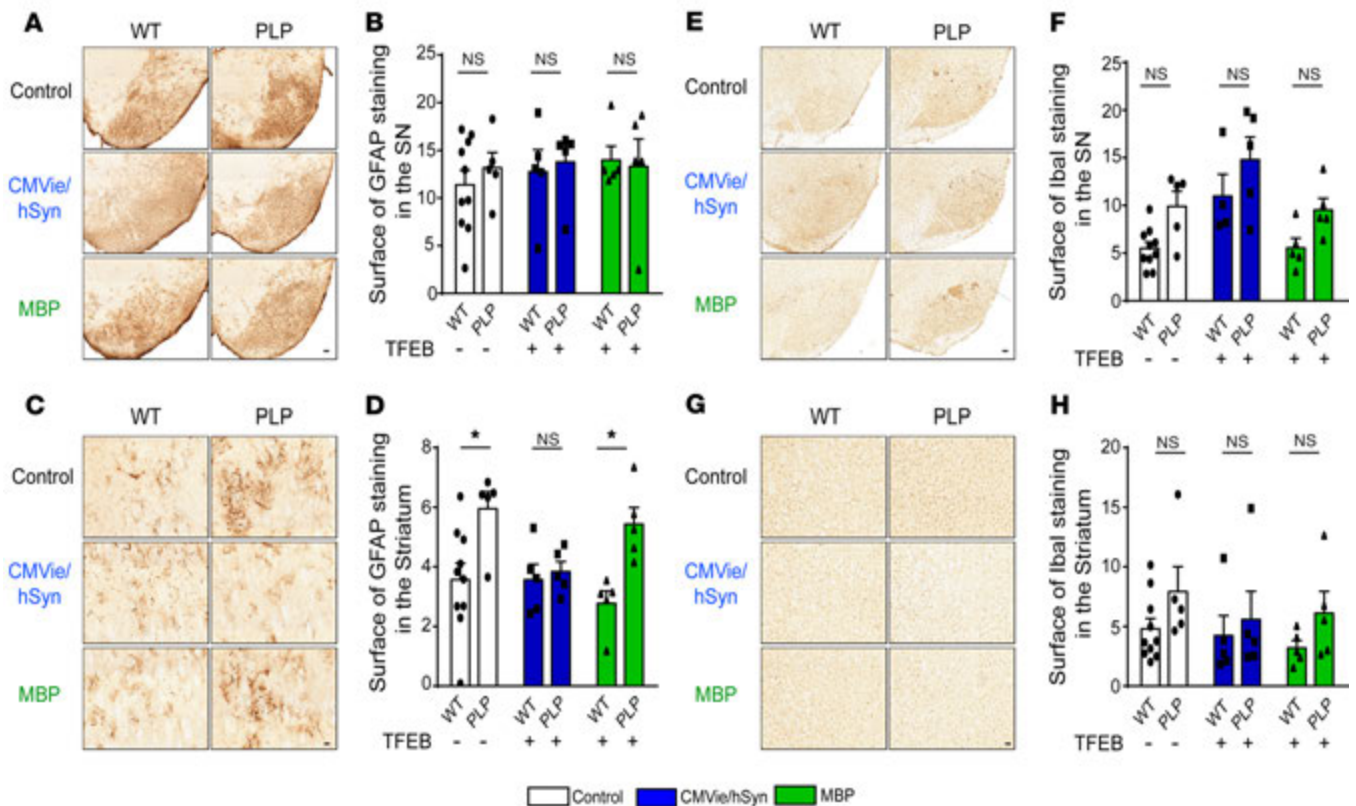


Figure 6. Lack of inflammatory reaction changes in the brain of TFEB-injected WT and PLP mice expressed under either the oligodendroglial or the neuronal promoter. (A and B) Representative images (A) and quantification (B) of GFAP-positive astrocytic immunostaining in the SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. Scale bar: 200 μ m. (C and D) Representative images (C) and quantification (D) of GFAP-positive astrocytic immunostaining in the striatum of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. Scale bar: 50 μ m. (E and F) Representative images (E) and quantification (F) of Iba1-positive microglial cells immunostaining in the SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. Scale bar: 200 μ m. (G and H) Representative images (G) and quantification (H) of Iba1-positive microglial cells immunostaining in the striatum of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. Scale bar: 50 μ m. $n = 5$ per group. White bars, control; blue bars, CMVie/hSyn-mTFEB-HA; green bars, MBP-mTFEB-3 \times Flag. Data represent mean \pm SEM. Comparisons were made using 2-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. * $P < 0.05$ compared with WT animals.

TFEB could rescue lysosomal membrane permeabilization in PLP mice. Accordingly, we measured Cathepsin-D (CTSD) activity, one of the most abundant lysosomal proteases, in lysosome-free cytosolic fractions. Compared with WT mice, PLP mice displayed significantly increased lysosomal membrane permeabilization, as evidenced by ectopic release of CTSD into the cytoplasm (Figure 8A). Following TFEB overexpression in either neurons or oligodendrocytes, cytosolic CTSD activity was fully restored to basal level of WT mice, suggesting either a protection of the lysosomal membrane integrity or enhancement of lysosomal biogenesis (Figure 8A). Further supporting a beneficial role on the lysosomal machinery, TFEB-injected PLP mice exhibited an increase in the mature form of CTSD expression levels in the SN compared with control PLP animals (Figure 8B). Similar results were obtained in mouse SN sections by immunostaining of the autophagosomal marker (LC3) and lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP-2) (Figure 8, C and D). We observed that the number of LC3- and LAMP-2-positive puncta in transduced dopaminergic neurons (Figure 8C; LC3, control vs. CMVie/hSyn-mTFEB PLP mice, $F_{[3,36]} = 16.75$, $P < 0.0001$; LAMP-2, control vs. CMVie/hSyn-mTFEB PLP mice, $F_{[3,47]} = 8.77$, $P = 0.001$) and in transduced oligodendrocytes (Figure 8D; LC3, control vs. MBP-mTFEB PLP mice, $F_{[3,47]} = 4.71$, $P = 0.005$; LAMP-2, control vs. MBP-mTFEB PLP mice, $F_{[3,36]} = 8.49$, $P = 0.0001$) in PLP mice was significantly increased compared with control PLP mice. Taken together, these data indicated that TFEB overexpression in neurons or oligodendrocytes increased autophagy flux through the formation of autophagosomes and lysosomal biogenesis, enhancing cellular clearance compared with the control group.

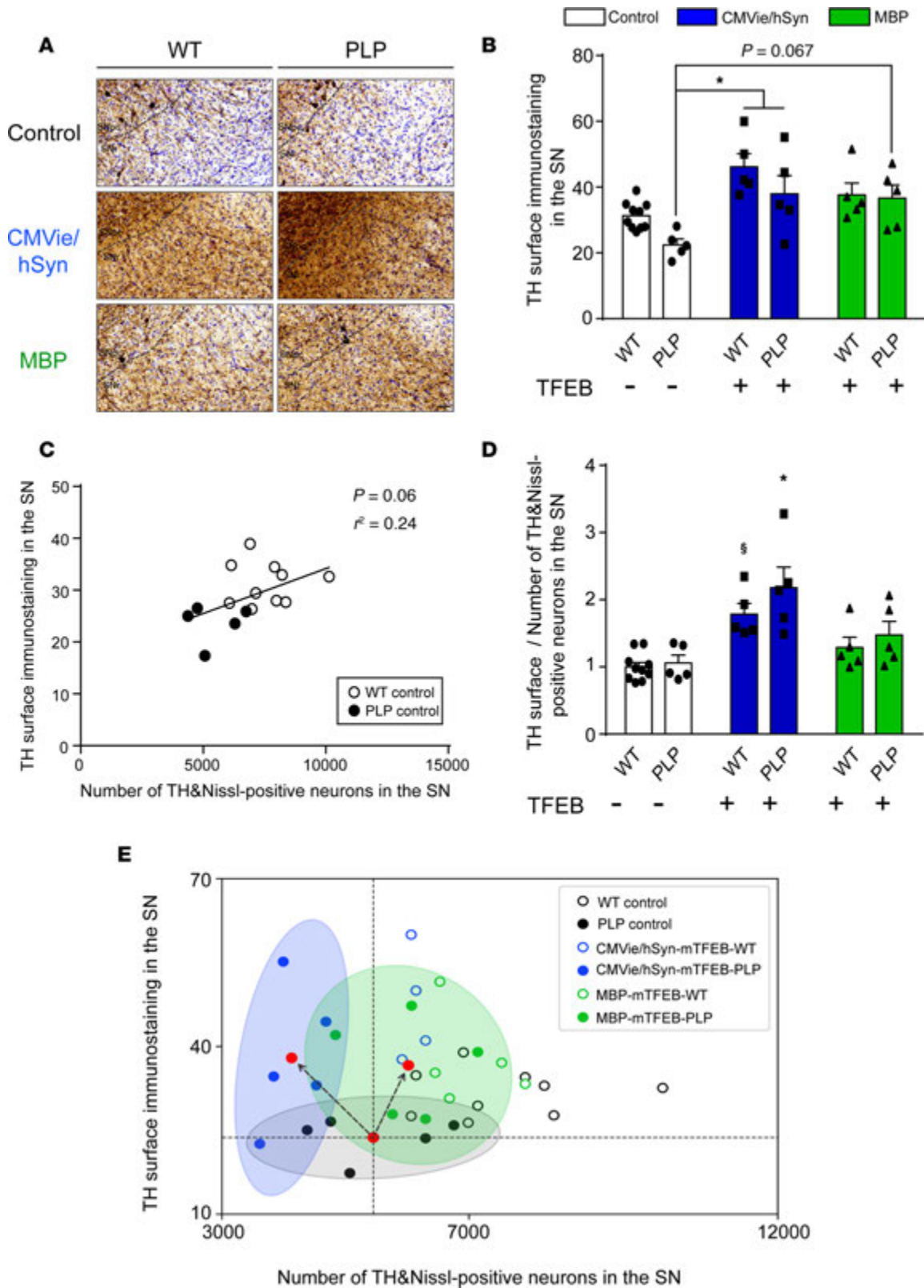


Figure 7. Both oligodendroglial- and neuronal TFEB-targeted overexpression induce neurotrophic effects in the brains of PLP mice. (A and B) Representative images (A) and quantification (B) of TH-positive immunostaining in the ipsilateral SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. Scale bar: 50 μ m. (C) Linear regression between TH-positive immunostaining and TH- and Nissl-positive cells in the SN of control WT (empty dark dots) and PLP mice (full dark dots). (D) Ratio of TH-positive immunostaining in the ipsilateral SN divided by the number of TH- and Nissl-positive neurons into the ipsilateral SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. $n = 5$ per group. White bars, control; blue bars, CMVie/hSyn-mTFEB-HA; green bars, MBP-mTFEB-3 \times Flag. (E) Scatter plot of the value of

TH surface immunostaining and the number of TH- and Nissl-positive neurons into the ipsilateral SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. Each dot represents 1 animal. Red dot corresponds to the center of mass of each experimental group, and the ellipses represent the 95% CI around the center of mass: PLP control (black); CMVie/hSyn-mTFEB PLP (blue); MBP-mTFEB-PLP (green). Dashed lines are arbitrarily centered on the center of mass of PLP control group to distinguish between neurotrophic effect (toward upper left quadrant), neuroprotection (lower right quadrant), and a combination of both (upper right quadrant) in AAV-injected PLP groups; black arrows represent the direction of the change. Data represent mean \pm SEM. Comparisons were made using 2-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. * $P < 0.05$ compared with control PLP animals. [‡] $P < 0.05$ compared with control WT animals.

Discussion

Here, we demonstrate that targeting neuronal expression of TFEB was sufficient to reduce synucleinopathy and prevent neurodegeneration in the A53T- α -syn rat model of PD, while only oligodendroglial overexpression of TFEB leads to neuroprotective effects in the MSA mouse model (Supplemental Figure 5). These beneficial effects were associated with a decrease of the pathological burden of α -syn through recovery of the ALP machinery. Overall, our study supports the idea that the cellular origin of the synuclein pathology dictates where enhancement of ALP should occur to allow a neuroprotective effect.

Numerous studies highlight lysosomal impairment as a key player in the pathogenesis of synucleinopathies such as PD and MSA (40, 41), and several therapeutic strategies based on ALP component overexpression, such as LAMP-2A (42) or Beclin-1 (43), have been used to increase autophagy machinery in experimental models of neurodegenerative diseases (44). Consistent with this approach, viral-mediated neuronal overexpression of TFEB has been used to mediate neuroprotection in a rat model of PD-overexpressing human WT α -syn (23). We here provide further evidence in another experimental model of PD. Neuronal expression of TFEB in the human mutated A53T- α -syn rat model of PD showed nigrostriatal dopaminergic neuroprotection and preserved motor function. Those beneficial effects were associated with decreased accumulation of α -syn.

However, no studies were performed so far to elucidate the role of the ALP in MSA pathogenesis and to exploit TFEB as a therapeutic target for this peculiar synucleinopathy. Here, we show that nuclear levels of TFEB are decreased in brains from patients with MSA and address the feasibility and therapeutic potential of restoring TFEB levels in selected cell types in a clinically relevant mouse model of MSA. Because MSA is first regarded as an oligodendroglial pathology, we tested whether TFEB overexpression either in neurons or in oligodendrocytes of the SN of PLP mouse model may result in different biological responses and alleviate MSA-related pathology. We here show that AAV-mediated expression of TFEB was sustainable in our model, and we observed nucleus localization of exogenous TFEB in neuronal cells or oligodendrocytes, which is necessary for its transcriptional role. Contrary to our rat model of PD, neuronal-targeted TFEB in PLP mice did not afford dopaminergic neuroprotection, reduction of synucleinopathy, or a decrease in inflammatory responses. This lack of efficacy of neuronal expression of TFEB in a MSA model could be due to the fact that, similar to the disease (45), neurons are less affected by the synucleinopathy compared with oligodendrocytes. Surprisingly, neuronal expression of TFEB in both WT and PLP mice showed potent neurotrophic effects, possibly linked to modulation of growth machinery, such as demonstrated in oncology (46), which should be further elucidated in future studies.

Importantly, we show that only specific oligodendroglial overexpression of TFEB in the PLP mice is able to partially overcome the deleterious effects associated with this model. According to our central hypothesis, overexpression of TFEB was effective in reversing the dopaminergic neurodegeneration in a higher magnitude at the level of striatal dopaminergic terminals compared with SN dopaminergic cell bodies through alleviation of the burden of aggregated α -syn. Notably, we confirmed that oligodendroglial-targeted TFEB overexpression also restores ALP function, attenuates lysosomal membrane permeabilization, and induces neurotrophic effects. Interestingly, the Akt pathway is involved in the process of myelination in the CNS (47), a role dedicated to the oligodendrocytes (48). This indicates that TFEB induces the Akt prosurvival pathways, which may help to reduce oligodendroglial dysfunction and lead to a more efficient myelin production, participating in dopaminergic pathway neuroprotection. Of course, future investigations will be necessary to determine its exact contribution and whether other prosurvival pathways are involved in the process of myelination, such as the TFEB gene target *MAPK1/3* (49).

Besides macroautophagy, cellular pathways such as CMA and UPS are involved in the degradation of α -syn, including in a MSA context (5, 50). Although enhancing ALP appears clearly efficient for mitigating

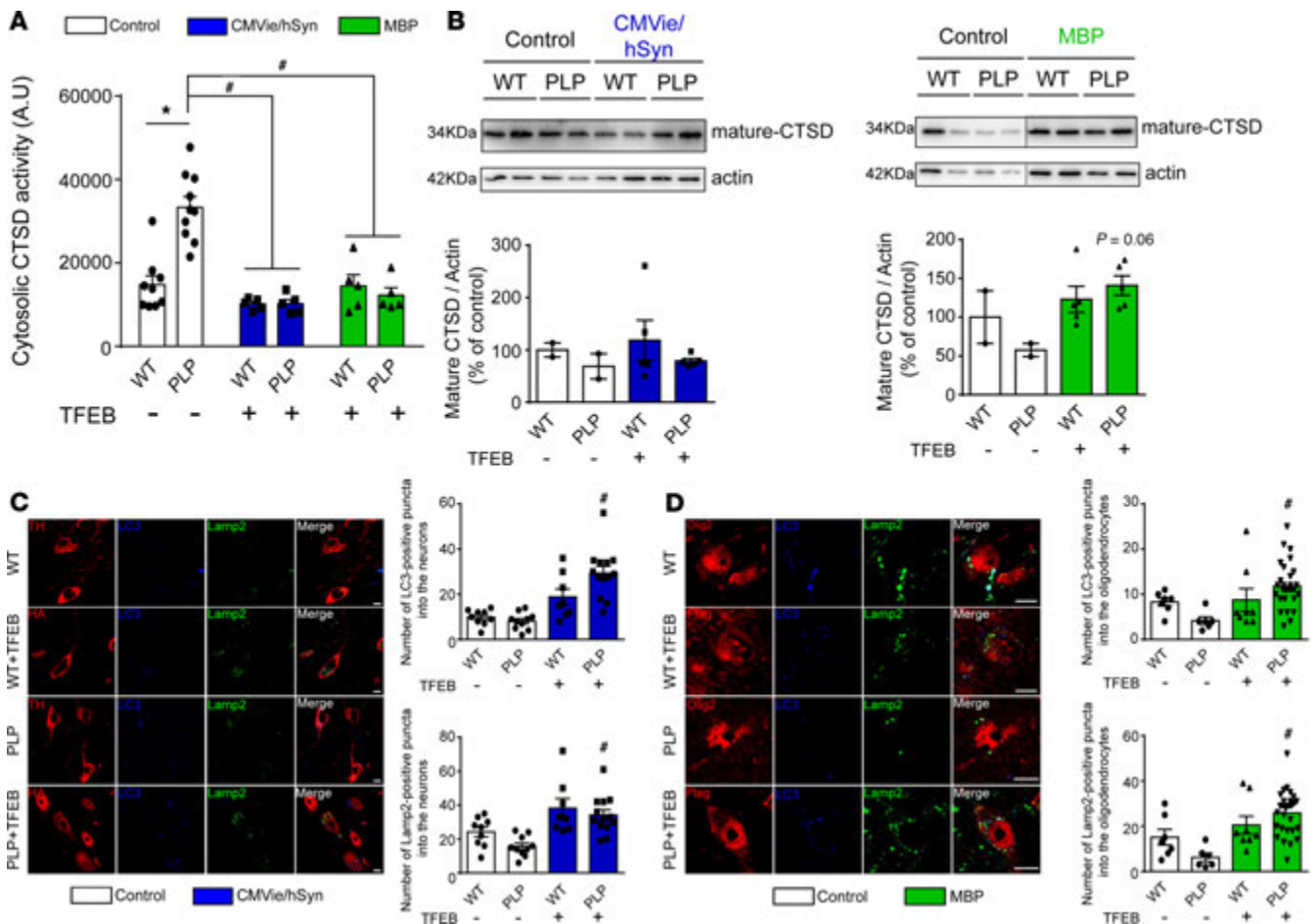


Figure 8. TFEB overexpression enhances autophagy-lysosomal pathway function in the brain of PLP mice. (A) Quantification of Cathepsin D (CTSD) activity in cytosolic lysosomal-free fraction from ipsilateral SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. (B) CTSD immunoblot levels from ipsilateral SN of control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected, and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. $n = 5$ per group. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous. (C) Confocal images (left) and quantification (right) using either TH or HA tag, Lamp-2, and LC3 antibodies in the ipsilateral SN of mice injected or not with the CMVie/hSyn-mTFEB-HA. The quantification represents the number of LC3- or Lamp-2-positive puncta into neuronal cells. Scale bar: 100 μm . $n = 9$ –13 per group. (D) Confocal images (left) and quantification (right) using either Olig2 or Flag tag, Lamp-2, and LC3 antibodies in the ipsilateral SN of mice injected or not with the MBP-mTFEB-Flag. The quantification represents the number of LC3- or Lamp-2-positive puncta into oligodendrocytes. Scale bar: 50 μm . $n = 7$ –30 per group. White bars, control; blue bars, CMVie/hSyn-mTFEB-HA; green bars, MBP-mTFEB-3 \times Flag. Data represent mean \pm SEM. Comparisons were made using 1-way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. $*P < 0.05$ compared with control WT animals. $\#P < 0.05$ compared with control PLP animals.

α -syn accumulation in order to achieve neuroprotection, it could be relevant in future studies to combine complementary strategies through gene therapy or pharmacological drugs to enhance CMA and/or the UPS systems, in addition to TFEB for further optimizing α -syn clearance in the oligodendrocytes, in an attempt to reach even stronger neuroprotective effects.

In summary, the present study validates TFEB as an interesting therapeutic strategy in PD in an additional PD rat model, which is consistent with previous reports (23, 26, 51). Further supporting this interest, we provide the first evidence to our knowledge that targeting TFEB in a cell-specific manner is crucial in MSA pathology — i.e., oligodendroglial-targeted TFEB, as opposed to neuronal-targeted TFEB, leads to neuroprotective and neurotrophic effects with improvement of α -syn clearance after activation of lysosomal biogenesis in a transgenic MSA mouse model. Overall, we confirmed the relevance of targeting TFEB expression to enhance ALP as a promising therapeutic approach for all synucleinopathies. TFEB has also been validated as an emerging therapeutic target to enhance lysosomal biogenesis and autophagy in different disorders — such as Alzheimer's disease, in which its astrocytic expression decreases misfolded Tau spreading (52) — but also for lysosomal storage disorders, such as Pompe Disease (53), as well as for ischemic injury (54), alcoholic liver disease (55, 56), and osteoarthritis (57). Recent reports in which

the FDA-approved drug 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (24, 25) or the natural compound pomegranate extract (58) are TFEB expression enhancers pave the way for future intervention.

In conclusion, increasing TFEB expression, by gene therapy or through pharmacological activation, into the CNS but also into peripheral organs becomes a strongly relevant therapeutic strategy. Further investigations to address the extent and localization of TFEB induction are still fundamental to provide the most clinically relevant and safest candidate and therapeutic strategy.

Methods

Plasmid production

Rat study. An AAV plasmid backbone containing the murine Tfeb cDNA fused to 3 Flag epitopes under control of the CMV promoter was provided by TIGEM AAV Vector Core Facility.

Mouse study. AAV containing the murine Tfeb cDNA fused to HA epitope under control of the CMV_{ie}/hSyn and an AAV containing the murine Tfeb cDNA fused to 3 Flag epitopes under control of the MBP promoter were cloned in our laboratory.

In vitro experiments

Assessment of Tfeb transgene expression. Human embryonic kidney 293 cells (HEK293T) were obtained from ATCC (catalog CRL-11268) and grown in DMEM Low Glucose (MilliporeSigma) plus 10% FBS. HEK293T cells were plated into 12-well plates before being transfected with the mTFEB-containing plasmids at 1.6 μ g DNA using Polyethylenimine-mediated (PEI-mediated) transfection for 4 hours. Then, medium was changed, and cells were maintained for 48 hours at 37°C in 5% CO₂ before being scraped into PBS. After a centrifugation step at 837 *g* for 5 minutes, the supernatant was removed, and cell pellet was lysed in 100 μ l of Laemmli buffer (Tris-HCl 25 mM, pH 6.8, glycerol 7.5%, SDS 1%, DTT 250 mM, and Bromophenol blue 0.05% [MilliporeSigma]) for biochemical experiment.

Analysis of dendritic length. Human neuroblastoma cell line, BE(2)-M17, obtained from ATCC (catalog CRL-2267) was cultured in OPTIMEM (Thermo Fisher Scientific) plus 10% FBS supplemented with 1% streptomycin/penicillin (MilliporeSigma). M17 were plated on coverslips into a 12-well plates to approximately 80% confluency before being treated with retinoic acid (MilliporeSigma) at 5 μ M for 24 hours (36). Cells were then transfected with the mTFEB-containing plasmids at 1.6 μ g DNA using PEI-mediated transfection for 4 hours. Then, medium was changed, and cells were maintained for 48 hours at 37°C in 5% CO₂ before being fixed with paraformaldehyde (VWR) at 4% for 30 minutes at 4°C for immunofluorescent staining. The fixed cells were washed 3 times with PBS 1 \times for 5 minutes each time. Cells were then permeabilized with Triton 0.01% in PBS-NDS 3% for 30 minutes at room temperature before being incubated with the following primary antibodies (diluted in 1:1000): β 3-tubulin (ab78078, Abcam) plus TFEB (Thermo Fisher Scientific, PA1-31552) overnight at 4°C. Cells were then washed 3 times with PBS 1 \times for 5 minutes each time before an incubation with donkey Alexa-conjugated antibodies (1:400, Invitrogen) in PBS. Cells were finally stained with DAPI solution (Invitrogen) at 10 μ M for 8 minutes before long washes. Coverslips were mounted onto slides using mounting solution (Dako), and image acquisitions were made on a wide-field Zeiss Imager M2 and a CCD Camera Hamamatsu C10600 using Explora Nova MorphoStrider software. The dendritic length was measured using a segmentation analysis with the simple neurite tracer plugin of ImageJ (NIH).

AAV vector production

Recombinant AAV9-CMV_{ie}/hSyn-mTFEB-HA-WPRE and AAV9-MBP-mTFEB-3 \times Flag-WPRE vectors were produced by PEI-mediated triple transfection of low-passage HEK-293T/17 cells (ATCC, catalog CRL-11268). The AAV expression plasmids were cotransfected with the adeno helper pAd Delta F6 plasmid (Penn Vector Core, catalog PL-F-PVADF6) and AAV Rep Cap pAAV2/9 plasmid (Penn Vector Core, catalog PL-T-PV008). AAV vectors were purified as previously described (59). Cells were harvested 72 hours after transfection, resuspended in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5), and lysed by 3 freeze-thaw cycles (37°C/–80°C). The cell lysate was treated with 150 units/ml benzonase (MilliporeSigma) for 1 hour at 37°C, and the crude lysate was clarified by centrifugation. Vectors were purified by iodixanol step gradient centrifugation, and they were concentrated and buffer-exchanged into Lactated Ringer's solution (Baxter) using vivaspin20 100 kDa cut-off concentrator (Sartorius Stedim). Titrations were performed at the platform study of the transcriptome (Neurocentre Magendie, INSERM U862). The genome-containing particle (gcp) titer was determined

by quantitative PCR (qPCR) using the Light Cycler 480 SYBR green master mix (Roche Diagnostics) with primers specific for the AAV2 ITRs (forward, 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3'; reverse, 5'-CGGCCT-CAGTGAGC GA-3') (60) on a Light Cycler 480 instrument. Purity assessment of vector stocks was estimated by loading 10 μ l of vector stock on 10% SDS acrylamide gels; total proteins were visualized using the Krypton Infrared Protein Stain according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). We obtained a titer of 3.06×10^{12} gcp/ml for the neuronal AAV9-CMVie/huSyn-mTFEB-HA-WPRE and a titer of 1.48×10^{13} gcp/ml for the oligodendroglial AAV9-MBP-mTFEB-3 \times Flag-WPRE.

Rodent experiments and stereotactic inoculations

Rat study. Thirty-two OFA Sprague Dawley rats (male, 2 months old) were injected unilaterally in the SNpc with 2 μ l of either the AAV-A53T α -syn (3.0×10^{12} vg/ml), the AAV-TFEB (3.0×10^{12} vg/ml), or a 1:1 mixture of AAV-A53T α -syn/AAV-TFEB. Under isoflurane anesthesia, rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments) and received 1 unilateral intranigral injections — either first track (−4.9 AP, 2.2 L, and −7.8 DV) or second track (coordinates from bregma: −5.1 antero-posterior [AP], 2 lateral [L], and −7.8 dorso-ventral [DV]) of either vector, as previously described in refs. 27 and 61.

Mouse study. Homozygous transgenic PLP- α -syn mice (MGI:3,604,008) overexpressing human α -syn under the PLP (32) and background-, age-, and sex-matched nontransgenic C57BL/6J mice were used in this study (WT mice) — male and female mixed (bred in house). PLP mice were fully backcrossed onto C57BL/6J background ($n > 15$ generations). They were bred and housed in a temperature-controlled room under a 12/12 hours dark/light cycle, with free access to food and water.

PLP and WT mice (2 months old) received 2 μ l of either AAV9-CMVie/huSyn-mTFEB-HA-WPRE or AAV9-MBP-mTFEB-Flag-WPRE virus (concentration: 3.06×10^{12} gcp/ml) by stereotactic delivery to the region immediately above the right SN (coordinates from bregma: AP, −2.9, L, −1.3, DV, −4.5) at a flow rate of 0.4 μ l/min, and the pipette was left in place for 5 minutes after injection to avoid leakage. Animals were euthanized after 5 months. Ten mice were used in each group — male and female mixed. Five brains of each group were immediately freshly frozen by immersion in a cold isopentane bath at −60°C during 5 minutes and stored at −80°C for biochemistry investigation. The 5 others were postfixed for 3 days in 10 ml of 4% paraformaldehyde at 4°C, cryoprotected in gradient 20% sucrose in PBS before being frozen by immersion in a cold isopentane bath (−60°C) for at least 5 minutes, and stored immediately at −80°C until sectioning for histochemical analysis.

mRNA extraction and qPCR

Nigral samples were homogenized in Tri-reagent (Euromedex), and RNA was isolated using a standard chloroform/isopropanol protocol (62). RNA was processed and analyzed following an adaptation of published methods (63). cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using RevertAid Premium Reverse Transcriptase and primed with oligo-dT primers and random primers (Fermentas). qPCR was performed using a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics). qPCR reactions were done in duplicate for each sample, using transcript-specific primers, cDNA (4 ng), and LightCycler 480 SYBR Green Master (Roche Diagnostics) in a final volume of 10 μ l. The PCR data were exported and analyzed in an informatics tool (Gene Expression Analysis Software Environment) developed at the NeuroCentre Magendie. For the determination of the reference gene, the Genorm method was used (64). Relative expression analysis was corrected for PCR efficiency and normalized against 2 reference genes. The valosin containing protein (Vcp) and the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt) genes were used as reference genes. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method (64).

Primer sequences: Vcp (NM_009503) forward, 5'-TGGCCGTCTAGATCAGCTCAT-3'; Vcp (NM_009503) reverse, 5'-TTTCGCAGATTGGCTTTTAGG-3'; Hprt (NM_013556) forward, 5'-AAACAATGCAAACCTTTGCTTTCC-3'; Hprt (NM_013556) reverse, 5'-CGAGAGGTCCTTTTC ACCAGC-3'; Mcoln1 (NM_053177) forward, 5'-TTCCTGCTGCAGAACGAGTTT-3'; Mcoln1 (NM_053177) reverse, 5'-CGTTCCCGAGAGGCTG ATTTTC-3'; Map1lc3a (NM_025735) forward, 5'-ACACCCATCGCTGACATCTATG-3'; Map1lc3a (NM_025735) reverse, 5'-TGGGAGGCGTAGAC-CATGTAG-3'; Lamp-2b (NM_010685) forward, 5'-AGATAATTGCTAGGCAGTGCCAA; Lamp-2b (NM_010685) reverse, 5'-GCTGCATGTAGA GGCCAATTTC-3'; CtsB (NM_007798) forward, 5'-ATGAGTGCCAGGCCTTTGAATA-3'; CtsB (NM_007798) reverse, 5'-GGCCATCGCCCAAATC-TAT-3'; CtsF (NM_019861) forward, 5'-GGGC AAGAACCTGGCTACAGTAT-3'; CtsF (NM_019861) reverse, 5'-GCCTGCTGAGGACAGATC TAGTTT-3'.

Biochemical analysis

Total protein extraction and quantification of mice tissue. Tissue patches ($n = 2-3$) of mouse SN were extracted on ice using 80 μ l of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate) with a protease inhibitor cocktail tablet (Complete Mini, Roche Diagnostics). The lysate was incubated on ice for 20 minutes, centrifuged at 18,220 g for 15 minutes at 4°C. The supernatant was collected, and the Bicinchoninic Acid (BCA) Assay (Thermo Fisher Scientific, USA) was used to determine the total amount of protein in the lysates and was then stored at -80°C . Based on total protein concentrations calculated from the BCA assays, aliquots of tissue lysates corresponding to known amounts of total protein per well were prepared for each animal in Laemmli buffer (Tris-HCl 25mM pH = 6.8, Glycerol 7.5%, SDS 1%, DTT 250mM and Bromophenol blue 0.05%) for the immunoblotting experiment.

Total protein extraction and quantification of human brain tissue. Human putamen and frontal cortex were dissected from fresh frozen postmortem midbrain samples from 7 patients with MSA and 6 healthy controls (mean age at death: 72 ± 2.83 years; frozen postmortem interval: 27.5 ± 6.65 hours; GIE Neuro-CEB BB-0033-00011). For human brain samples of the putamen or the frontal cortex, we separated cytosolic and nuclear fractions by methods previously described (28). Proteins were extracted on ice using 1 ml of buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol) with a protease inhibitor cocktail tablet (Complete Mini, Roche Diagnostics). The homogenate was centrifuged at 837 g for 5 minutes at 4°C. The supernatant was collected as cytosolic fractions. For nuclear fractions, the pellet was dissolved in buffer B (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol) with a protease inhibitor cocktail tablet (Complete Mini, Roche Diagnostics) and vortexed on ice for 15 minutes. The homogenate was incubated for 30 minutes at 4°C under constant shaking before a centrifugation at 18,220 g for 10 minutes at 4°C. Supernatant was collected as nuclear fractions. The BCA assay was used to determine the total amount of protein in the nuclear and cytosolic fractions and was then stored at -80°C . Based on total protein concentrations calculated from the BCA assays (Thermo Fisher Scientific), aliquots of tissue fractions corresponding to known amounts of total protein per well were prepared for each individual in Laemmli buffer (Tris-HCl 25mM pH = 6.8, Glycerol 7.5%, SDS 1%, DTT 250mM and Bromophenol blue 0.05%) for the immunoblotting experiment.

Immunoblotting analysis. Western blots were run from 10 μ g of protein extracts from mouse SN, 20 μ l of transfected cell lysates, and 20 μ g of protein extracts from brain patients, separated by SDS-PAGE and transferred to 0.2 μ m nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Incubation of the primary antibodies was performed overnight at 4°C with goat anti-mTFEB (1:1,000, Thermo Fisher Scientific, PA1-31552), rabbit anti-huTFEB (1:1,000, Cell Signaling Technologies, 4240), goat anti-HA (1:1,000, Genscript, A00168), mouse anti-Flag (1:1,000, MilliporeSigma, F3165), mouse anti-cath-D (1:1,000, MilliporeSigma, C0715), rabbit anti-Akt (1:1,000, Cell Signaling Technology, 9272), and rabbit anti-Ser473-phosphorylated-Akt (1:1,000, Cell Signaling Technology, 9271). Mouse anti-actin (1:2000, MilliporeSigma, A5441) was used to control equal loading except for nuclear fraction of brains patients (LaminA/C, 1:2,000, Genscript, A01455). Appropriate secondary antibodies coupled to peroxidase were revealed using a Super Signal West Pico Chemiluminescent kit (Immobilon Western, Chemiluminescent HRP substrate, MilliporeSigma). Chemiluminescence images were acquired using the ChemiDoc+XRS system measurement (Bio-Rad). Signals per lane were quantified using ImageJ, and a ratio of signal on loading per sample was performed and used in statistical analyses. Regarding biochemical experiments on mice tissue, each graph regarding immunoblotting experiments on mice represents the quantified protein level normalized by actin protein levels. Regarding TFEB protein levels for MSA brains, the calculated ratio nuclear TFEB/cytosolic TFEB corresponds to the ratio “nuclear TFEB/Lamin” divided by the ratio “cytosolic TFEB/Actin”. See complete unedited blots in the supplemental material.

CTSD activity assay. CTSD activity was measured in cell lysates using a fluorometric CTSD activity assay kit (Abcam, ab65302) in accordance with the manufacturer’s instructions. Fluorescence was measured on a FLUOstar Optima microplate analyzer (BMG Labtech).

Histopathological analysis

Extent of lesion. To assess the integrity of the nigrostriatal pathway, TH IHC was performed on SNpc and striatal sections. Briefly, sections from 3 representative levels of the striatum (anterior, medial, and posterior) and serial sections (1 of 6) corresponding to the whole SNpc were incubated with a rabbit monoclonal antibody raised against mouse TH (Abcam, EP1532Y, ab137869, 1:5,000) for 1 night at room temperature

and revealed by an anti-rabbit peroxidase EnVision™ system (DAKO, K400311) followed by DAB visualization. Free-floating SNpc sections were mounted on gelatinized slides, counterstained with 0.1% cresyl violet solution, dehydrated, and cover-slipped, while striatal sections were mounted on gelatinized slides and cover-slipped. The extent of the lesion in the striatum was quantified by OD. Sections were scanned in an Epson expression 10000XL high-resolution scanner, and images were used in ImageJ open source software to compare the gray level in the putamen. TH-positive SNpc cells were counted by stereology, blind with regard to the experimental condition using a Leica DM6000B motorized microscope coupled with the Mercator software (Explora Nova). The SN was delineated for each slide, and probes for stereological counting were applied to the map obtained. Each TH-positive cell with its nucleus included in the probe was counted. The optical fractionator method was finally used to estimate the total number of TH-positive cells in the SNpc of each mouse hemisphere. In addition, we measured the Nissl cell count and the surface of TH occupied in SN to fully characterize the pattern of dopaminergic cell loss in the SN. The surface is an additional quantification method that we use in tissue sections. For these analyses, a specific staining process was used to keep all tissues together in the same solution during the staining process, counterstained with 0.1% cresyl violet solution. Then, high-resolution whole color slide images were first acquired with the 3D Histech Panoramic Scanner at the 20× magnification, with 5 layers in extended mode. Each image was opened in the off-line MERCATOR PRO 7.12.3 software (Explora Nova), and the mapping of all regions of interest was made. Brightness and contrast rules were applied to the RGB pictures to optimize details without any saturation of the image. The color thresholding tool was then used to select the threshold corresponding to the brown color revealed by the DAB staining. The threshold has been established on the basis of the staining intensity to detect the maximum of DAB staining. The file of the threshold parameters was saved and applied to all measurements for each animal/staining. Before performing the quantification, the threshold was randomly applied to some images of different treatment groups to verify the accuracy of settings. In each region, the software extracted the surface corresponding to the threshold defined. The surface parameter was finally expressed as a ratio of the total surface of each area of interest. Conversely, the stereology approach allowed us to obtain an unbiased number of cells, while the threshold surface analysis allowed us to quantify any antibody-based staining in the region of interest. Both, therefore, are needed.

α-Syn pathology. Synucleinopathy has been assessed with a mouse monoclonal antibody raised against human α -syn (Novex, Invitrogen, LB509, 180215, 1:1,000) using the M.O.M. Vector kit protocol and against phosphorylated α -syn (Abcam, EP1536Y, ab51253, 1:5,000) immunostaining, as we previously reported (27, 65). Briefly, selected sections of 1 rostro-caudal level of SN and striatum were specifically identified and incubated in the same well to allow direct comparison of immunostaining intensity. For pretreatment with PK, sections were incubated first with PK at 10 μ g/ml in PBS before long sequential washes in distilled water and then in PBS. Sections were incubated overnight at room temperature with the aforementioned antibodies. The following day, revelation was performed with anti-species peroxidase EnVision system (DAKO) followed by DAB incubation. Sections were then mounted on gelatinized slides, dehydrated, counter-stained if necessary, and cover-slipped until further analysis. LB509-positive dots in SN were counted by stereology, blind with regard to the experimental condition using a Leica DM6000B motorized microscope coupled with the Mercator software (Explora Nova). The SN was delineated for each slide, and probes for stereological counting were applied to the map obtained (size of probes was 60 × 80 μ m) and transform as object after counting. The optical fractionator method was finally used to estimate the total number of LB509-positive dots per μ m² in the SN of each mouse. LB509 immunostaining-positive surface in the striatum and phosphorylated α -syn immunostaining-positive surface quantification in the SN and the striatum were performed as previously (27).

Inflammation. Inflammatory processes in the SN and the striatum were measured through GFAP/S-100 (DAKO, Z0334/Abnova, PAP11341) and Iba1 (Abcam, ab5076) IHC. Striatal sections of all animals were incubated together overnight with a mix of rabbit antibodies raised against GFAP and S-100 for the astroglial staining (respective dilutions 1:2,000 and 1:1,000) and with a rabbit anti-Iba1 antibody for the microglial staining (dilution 1:1,000). These signals were revealed with anti-species peroxidase EnVision system (DAKO) followed by DAB incubation. Sections were mounted on slides, dehydrated, and cover-slipped. Sections were scanned in a high-resolution scanner (PanScan, 3D Histech) at ×20 magnification, and the quantification of GFAP-positive astrocytic reaction or Iba1-positive microglial reaction was estimated by an immunostaining-positive surface quantification at regional levels with the Mercator software (Explora Nova).

Immunofluorescent images

For 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase (CNPase) and Flag fluorescent costaining. For CNPase staining, tyramide signal amplification (TSA) protocol kit was used. Briefly, sections were permeabilized for 30 minutes in TSA blocking buffer containing 0.1% Tween20 (MilliporeSigma) and incubated overnight at room temperature with mouse anti-CNPase (Abcam, ab6319, 1:1,000) primary antibody diluted in a 1% goat serum/PBS buffer. Sections were then washed with PBS 3 times for 10 minutes and then incubated for 10 minutes in PBS/H₂O₂ 3%. After washing, sections were incubated for 2 hours with a goat biotinylated anti-mouse (Vector Laboratories, BA-9200) (1:200) at room temperature. Sections were then washed 3 times in PBS before being blocked with a streptavidin HRP diluted in TSA blocking solution (1:100) for 30 minutes. After an amplification step with Biotinyl tyramide diluted in amplification diluent followed by 3 washes in PBS, sections were incubated with goat anti-mouse biotinylated IgG conjugated to AlexaFluor probe 488 (Invitrogen, 1:1000) for 30 minutes. Sections were then washed and incubated with rabbit anti-Flag (MilliporeSigma, F7425, 1:500) overnight before 3 steps of wash. Then, sections were incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to AlexaFluor 568 (Invitrogen, 1:1,000) for 1.5 hours in PBS. Tissues were then washed with PBS and mounted in DAPI-containing mounting media (Vectashield). Illustrative images were acquired using a confocal microscope Leica SP8 at the BioImaging Center in Bordeaux.

HA and TH fluorescent costaining. Sections were permeabilized for 1 hour in a 4% donkey serum/PBS blocking buffer containing 0.3% Triton X-100 (MilliporeSigma) and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in a 1% Donkey serum/PBS buffer: rabbit anti-TH (Abcam, EP1532Y, ab137869, 1:2,000) and goat anti-HA (Genscript, A00168, 1:500). Following incubation with primary antibodies, tissues were washed with PBS 3 times for 10 minutes and incubated for 1.5 hours at room temperature with a combination of corresponding donkey anti-species IgG conjugated to AlexaFluor probe (Invitrogen, 1:400). Tissues were then washed with PBS and mounted in DAPI-containing mounting media (Vectashield). Illustrative images were acquired using a confocal microscope Leica SP8 at the BioImaging Center in Bordeaux.

Lamp2 and LC3 staining. Sections were permeabilized for 1 hour in a 4% donkey serum/PBS blocking buffer containing 0.3% Triton X-100 (MilliporeSigma) and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in a 1% donkey serum/PBS buffer: mouse anti-TH (Merck, MAB318, 1:2,000), goat anti-HA (Genscript, A00168, 1:500), mouse anti-Olig2 (Merck, MABN50, 1:500), mouse anti-Flag (1:1,000, MilliporeSigma, F3165, 1:500), rat anti-Lamp-2 (Abcam, Ab193, ab25339, 1:1,000), and rabbit anti-LC3 (Novus Biological, NB2220, 1:1,000). Following incubation with primary antibodies, tissues were washed with PBS 3 times for 10 minutes and incubated for 1.5 hours at room temperature with a combination of corresponding donkey anti-species IgG conjugated to AlexaFluor probe (Invitrogen, 1:400). Tissues were then washed with PBS and mounted in DAPI-containing mounting media (Vectashield). Illustrative images were acquired using a confocal microscope Leica SP8 at the BioImaging Center in Bordeaux.

Statistics

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). For rat experiments, comparisons among means were performed by using 1-way ANOVA followed, if appropriate, by a pairwise comparison between means by Tukey post hoc analysis. For in vivo mice experiments, comparisons among means were performed by using 2-way ANOVA followed, if appropriate, by a pairwise comparison between means by Tukey post hoc analysis. For in vitro experiments, comparisons among means were performed by using nonparametric 2-tailed *t* test or 1-way ANOVA followed, if appropriate, by a pairwise comparison between means by Tukey post hoc analysis. All values are expressed as the mean ± SEM. Each dot in the scatter plot represents 1 individual. In all analyses, statistical significance was set at *P* < 0.05. For Figure 7C, code was written using the Python scientific stack and plotted using Matplotlib (66–68).

Study approval

Animals. Experiments were performed in accordance with the European Union directive of September 22, 2010 (2010/63/EU), on the protection of animals used for scientific purposes. The Institutional Animal Care and Ethical Committee of Bordeaux University (CE50, France) approved experiments accepted by the ministry under reference APAFIS 9921-2017031014326763 v5.

Human tissues. Samples were obtained from brains collected in a Brain Donation Program of the Brain Bank GIE NeuroCEB run by a consortium of Patient Associations: association for research on multiple sclerosis (ARSEP), cerebellar ataxias (CSC), France Alzheimer, and France Parkinson. The consents were

signed by the patients themselves or their next of kin in their name, in accordance with the French Bioethical Laws. The Brain Bank GIE NeuroCEB (Bioresource Research Impact Factor number BB-0033-00011) has been declared at the Ministry of Higher Education and Research and has received approval to distribute samples (agreement AC-2013-1887).

Author contributions

MLA, MB, BD, and EB conceived and designed the study. MB performed all the surgeries, histochemical and immunofluorescent experiments and analysis on the A53T- α -syn PD rat model. MLA performed all the surgeries, along with histochemical, biochemical, and immunofluorescent experiments and analysis on the PLP mouse model of MSA. ND produced the viruses used in the study. MLT performed the patch extraction on mice tissues. ED participated in in vivo immunofluorescent experiments and confocal imaging acquisition. SD participated in immunohistochemical protocols and analysis for the MSA mouse model. AB provided the AAV plasmid backbone containing the murine Tfeb cDNA. POF worked as a referent for the PLP mouse model. WGM provided human brain tissues from MSA patients. MLA, MB, BD, SD, and EB analyzed the data. MLA, MB, BD, and EB wrote the paper. All authors discussed the results, assisted in the preparation, and contributed to the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Nathalie Biendon and Leslie-Ann Largette for her technical assistance. This work was supported by Fondation de France Grant number 00066525 (BD). The help of the Bordeaux Imaging Center — part of the national infrastructure France BioImaging, granted by ANR-10INBS-04-0 — is acknowledged. Animal experiments were performed at the Animal Facilities of the University of Bordeaux, supported by the Région Nouvelle-Aquitaine. We also thank Thierry Leste-Lasserre and the genomic platform of Magendie Institute for mRNA extraction and qPCR analysis. The samples were obtained from the Brain Bank GIE NeuroCEB (BRIF number 0033-00011), funded by France Alzheimer, France Parkinson, ARSEP, and Connaître les Syndromes Cérébelleux, to which we express our gratitude. MLA is a recipient of a MSER fellowship (France). MB was supported by grants from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche fellowship and the France Parkinson Foundation. The LABEX Brain, the University of Bordeaux, and the Centre National de la Recherche Scientifique provided infrastructural support.

Address correspondence to: Benjamin Dehay, CNRS UMR 5293, Institute of Neurodegenerative Diseases, University of Bordeaux, Centre Broca Nouvelle-Aquitaine, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. Phone: 33.0.5.33.51.47.95; Email: benjamin.dehay@u-bordeaux.fr.

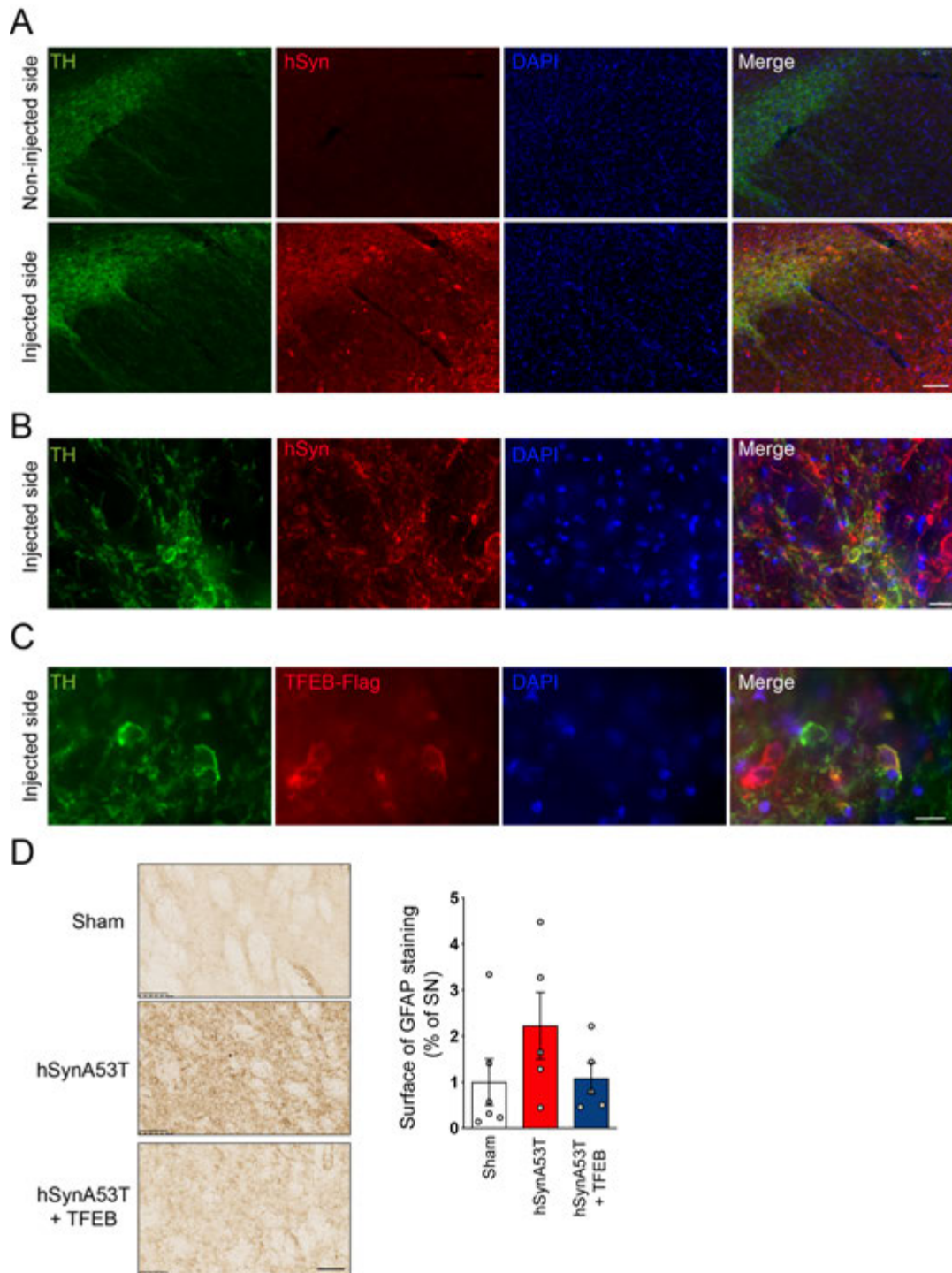
MB's present address is: Albert Einstein College of Medicine. Department of Developmental and Molecular Biology, Bronx, New York 10461, USA.

1. Dehay B, et al. Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol.* 2015;14(8):855–866.
2. Yan R, et al. Synergistic neuroprotection by coffee components eicosanoyl-5-hydroxytryptamide and caffeine in models of Parkinson's disease and DLB. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(51):E12053–E12062.
3. Bourdenx M, Bezdard E, Dehay B. Lysosomes and α -synuclein form a dangerous duet leading to neuronal cell death. *Front Neuroanat.* 2014;8:83.
4. Dehay B, et al. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2010;30(37):12535–12544.
5. Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. α -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Mol Neurobiol.* 2013;47(2):537–551.
6. Chu CT, Zhu J, Dagda R. Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. *Autophagy.* 2007;3(6):663–666.
7. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.* 2004;305(5688):1292–1295.
8. Martinez-Vicente M, et al. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest.* 2008;118(2):777–788.
9. Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem.* 2008;283(35):23542–23556.
10. Scervo A, Bourdenx M, Pampliega O, Cuervo AM. Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2018;17(9):802–815.
11. Ebrahimi-Fakhari D, et al. Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in

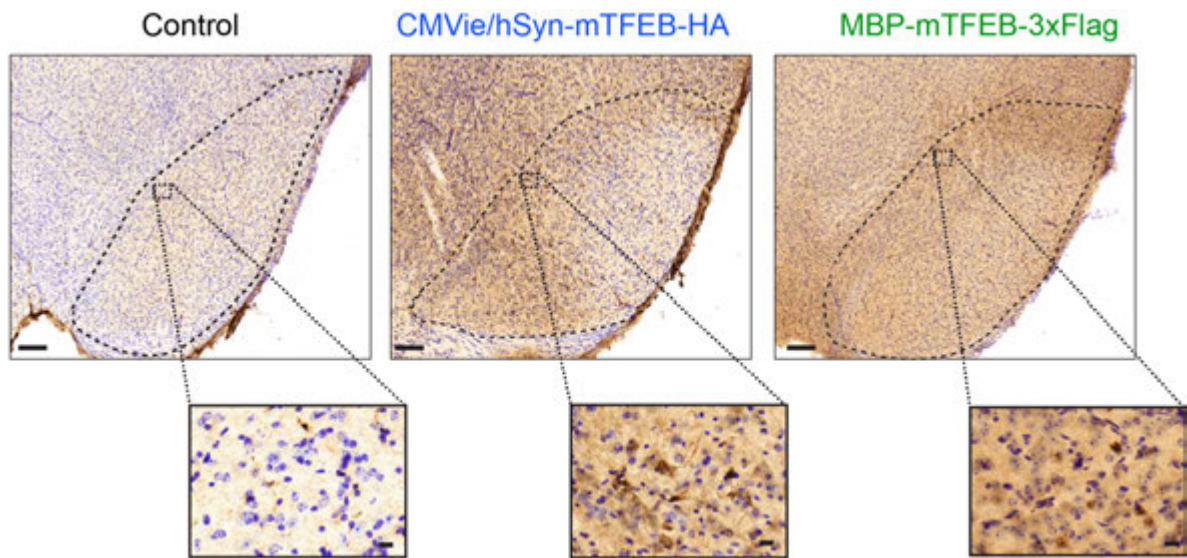
- the degradation of α -synuclein. *J Neurosci*. 2011;31(41):14508–14520.
12. Lee HJ, Khoshaghideh F, Patel S, Lee SJ. Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *J Neurosci*. 2004;24(8):1888–1896.
 13. Fernagut PO, et al. Multiple system atrophy: a prototypical synucleinopathy for disease-modifying therapeutic strategies. *Neurobiol Dis*. 2014;67:133–139.
 14. Schwarz L, Goldbaum O, Bergmann M, Probst-Cousin S, Richter-Landsberg C. Involvement of macroautophagy in multiple system atrophy and protein aggregate formation in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci*. 2012;47(2):256–266.
 15. Tanji K, et al. Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol Dis*. 2013;49:190–198.
 16. Monzio Compagnoni G, et al. Mitochondrial Dysregulation and Impaired Autophagy in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons of Multiple System Atrophy. *Stem Cell Reports*. 2018;11(5):1185–1198.
 17. Song W, et al. TFEB regulates lysosomal proteostasis. *Hum Mol Genet*. 2013;22(10):1994–2009.
 18. Cortes CJ, La Spada AR. TFEB dysregulation as a driver of autophagy dysfunction in neurodegenerative disease: Molecular mechanisms, cellular processes, and emerging therapeutic opportunities. *Neurobiol Dis*. 2019;122:83–93.
 19. Palmieri M, et al. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet*. 2011;20(19):3852–3866.
 20. Martini-Stoica H, Xu Y, Ballabio A, Zheng H. The Autophagy-Lysosomal Pathway in Neurodegeneration: A TFEB Perspective. *Trends Neurosci*. 2016;39(4):221–234.
 21. Settembre C, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*. 2011;332(6036):1429–1433.
 22. Settembre C, et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J*. 2012;31(5):1095–1108.
 23. Decressac M, Mattsson B, Weikop P, Lundblad M, Jakobsson J, Björklund A. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(19):E1817–E1826.
 24. Kilpatrick K, Zeng Y, Hancock T, Segatori L. Genetic and chemical activation of TFEB mediates clearance of aggregated alpha-synuclein. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120819.
 25. Song W, Wang F, Lotfi P, Sardiello M, Segatori L. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin promotes transcription factor EB-mediated activation of autophagy: implications for therapy. *J Biol Chem*. 2014;289(14):10211–10222.
 26. Torra A, et al. Overexpression of TFEB Drives a Pleiotropic Neurotrophic Effect and Prevents Parkinson's Disease-Related Neurodegeneration. *Mol Ther*. 2018;26(6):1552–1567.
 27. Bourdenx M, et al. Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by α -synuclein overexpression. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:46.
 28. Wang H, Wang R, Xu S, Lakshmana MK. Transcription Factor EB Is Selectively Reduced in the Nuclear Fractions of Alzheimer's and Amyotrophic Lateral Sclerosis Brains. *Neurosci J*. 2016;2016:4732837.
 29. Bassil F, et al. Insulin resistance and exendin-4 treatment for multiple system atrophy. *Brain*. 2017;140(5):1420–1436.
 30. Bassil F, et al. Reducing C-terminal truncation mitigates synucleinopathy and neurodegeneration in a transgenic model of multiple system atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(34):9593–9598.
 31. Fernagut PO, et al. Age-related motor dysfunction and neuropathology in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Synapse*. 2014;68(3):98–106.
 32. Kahle PJ, et al. Hyperphosphorylation and insolubility of alpha-synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes. *EMBO Rep*. 2002;3(6):583–588.
 33. Refolo V, et al. Progressive striatonigral degeneration in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: translational implications for interventional therapies. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6(1):2.
 34. Napolitano G, et al. mTOR-dependent phosphorylation controls TFEB nuclear export. *Nat Commun*. 2018;9(1):3312.
 35. Puertollano R, Ferguson SM, Brugarolas J, Ballabio A. The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization. *EMBO J*. 2018;37(11):e98804.
 36. Filograna R, et al. Analysis of the Catecholaminergic Phenotype in Human SH-SY5Y and BE(2)-M17 Neuroblastoma Cell Lines upon Differentiation. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0136769.
 37. Hsuan SL, Klintworth HM, Xia Z. Basic fibroblast growth factor protects against rotenone-induced dopaminergic cell death through activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 and phosphatidylinositol-3 kinase pathways. *J Neurosci*. 2006;26(17):4481–4491.
 38. Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 2008;27(50):6434–6451.
 39. Vila M, Bové J, Dehay B, Rodríguez-Muela N, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization in Parkinson disease. *Autophagy*. 2011;7(1):98–100.
 40. Bourdenx M, Dehay B. What lysosomes actually tell us about Parkinson's disease? *Ageing Res Rev*. 2016;32:140–149.
 41. Lie PPY, Nixon RA. Lysosome trafficking and signaling in health and neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis*. 2019;122:94–105.
 42. Xilouri M, et al. Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates α -synuclein-induced neurodegeneration. *Brain*. 2013;136(Pt 7):2130–2146.
 43. Spencer B, et al. Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci*. 2009;29(43):13578–13588.
 44. Boland B, et al. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(9):660–688.
 45. Valera E, Masliah E. The neuropathology of multiple system atrophy and its therapeutic implications. *Auton Neurosci*. 2018;211:1–6.
 46. Di Malta C, et al. Transcriptional activation of RagD GTPase controls mTORC1 and promotes cancer growth. *Science*. 2017;356(6343):1188–1192.
 47. Flores AI, et al. Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *J Neurosci*. 2008;28(28):7174–7183.
 48. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):37–53.
 49. Gaesser JM, Fyffe-Maricich SL. Intracellular signaling pathway regulation of myelination and remyelination in the CNS. *Exp Neurol*. 2016;283(Pt B):501–511.
 50. Fellner L, Buchinger E, Brueck D, Irschick R, Wenning GK, Stefanova N. Limited effects of dysfunctional macroautophagy on

- the accumulation of extracellularly derived α -synuclein in oligodendroglia: implications for MSA pathogenesis. *BMC Neurosci.* 2018;19(1):32.
51. Carballo-Carbajal I, et al. Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. *Nat Commun.* 2019;10(1):973.
 52. Martini-Stoica H, et al. TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading. *J Exp Med.* 2018;215(9):2355–2377.
 53. Spanpanato C, et al. Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Mol Med.* 2013;5(5):691–706.
 54. Liu Y, et al. Neuronal-targeted TFEB rescues dysfunction of the autophagy-lysosomal pathway and alleviates ischemic injury in permanent cerebral ischemia. *Autophagy.* 2019;15(3):493–509.
 55. Bala S, Szabo G. TFEB, a master regulator of lysosome biogenesis and autophagy, is a new player in alcoholic liver disease. *Dig Med Res.* 2018;1:16.
 56. Chao X, Ni HM, Ding WX. Insufficient autophagy: a novel autophagic flux scenario uncovered by impaired liver TFEB-mediated lysosomal biogenesis from chronic alcohol-drinking mice. *Autophagy.* 2018;14(9):1646–1648.
 57. Zheng G, et al. TFEB, a potential therapeutic target for osteoarthritis via autophagy regulation. *Cell Death Dis.* 2018;9(9):858.
 58. Tan S, et al. Pomegranate activates TFEB to promote autophagy-lysosomal fitness and mitophagy. *Sci Rep.* 2019;9(1):727.
 59. Zolotukhin S, et al. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* 1999;6(6):973–985.
 60. Aurnhammer C, et al. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum Gene Ther Methods.* 2012;23(1):18–28.
 61. Engeln M, et al. Levodopa gains psychostimulant-like properties after nigral dopaminergic loss. *Ann Neurol.* 2013;74(1):140–144.
 62. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156–159.
 63. Bustin SA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611–622.
 64. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–408.
 65. Recasens A, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol.* 2014;75(3):351–362.
 66. Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. 2007.
 67. Jones E, Oliphant T, Peterson P. SciPy: Open Source Scientific Tools for Python. 2001.
 68. van der Walt S, Colbert SC, Varoquaux G. The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation. *Computing in Science and Engineering.* 2011;13(2):22–30.

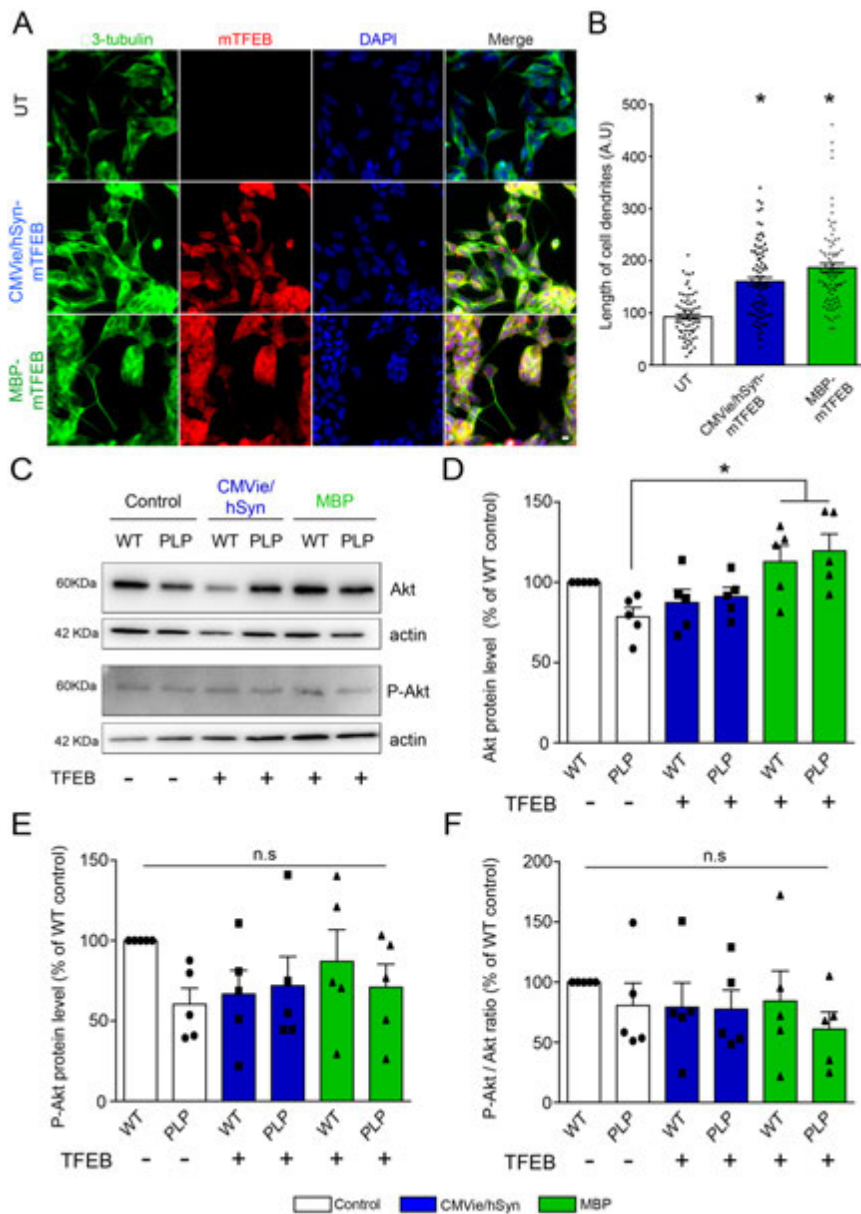
SUPPLEMENTAL INFORMATION



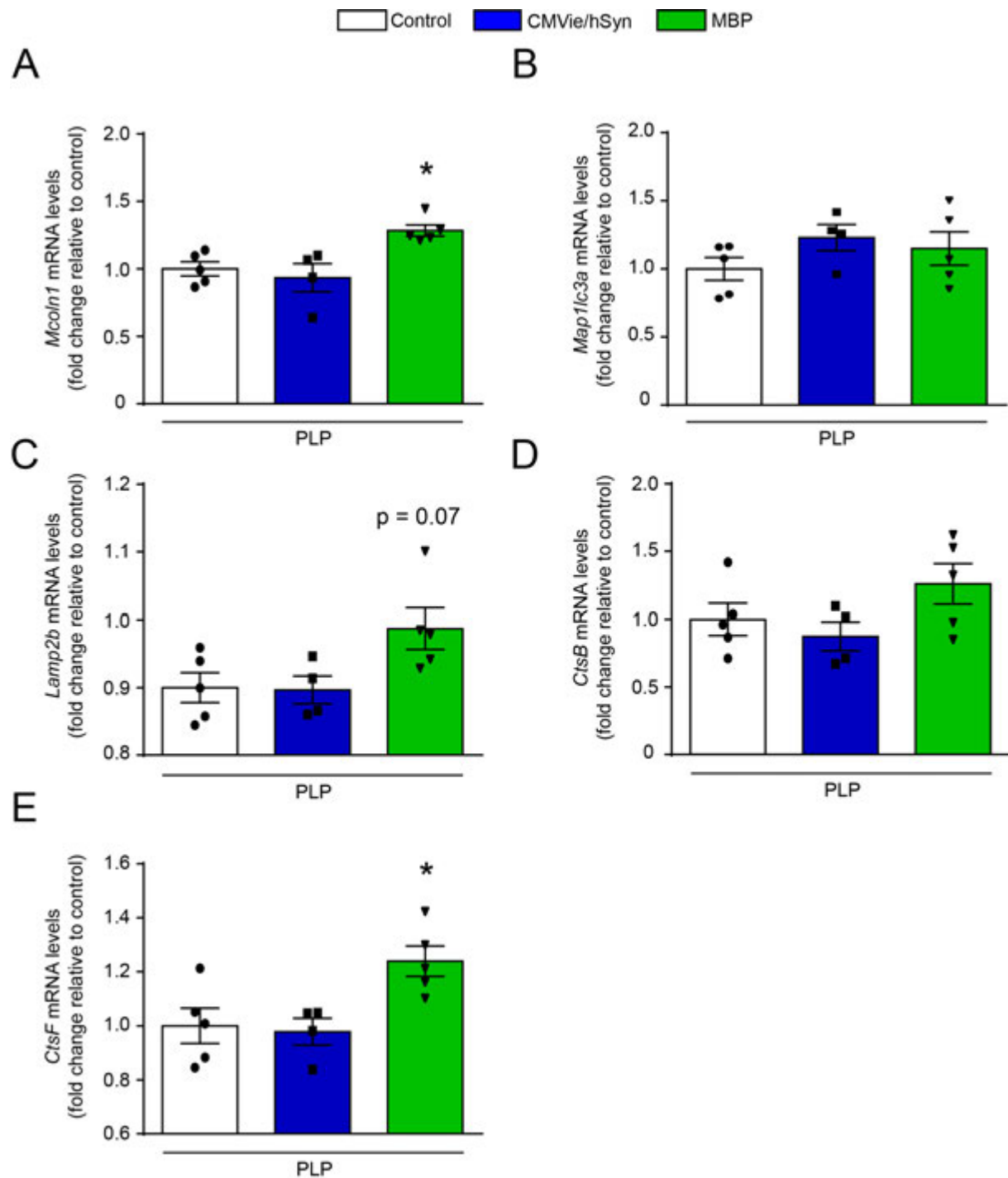
Supplementary Figure 1. Virus transduction and astrogliosis in the human A53T- α -syn rat model of Parkinson's disease. (A-B) AAV-delivered human A53T α -syn is expressed in TH-positive neurons in the SNpc as revealed by anti-human α -syn immunodetection. Scale bars = 100µm (A), 20µm (B). (C) AAV-mediated TFEB-3xFLAG is expressed in TH-positive neurons in the SNpc as revealed by anti-FLAG immunodetection. Scale bar = 20µm. (D) TFEB overexpression decreases astrogliosis associated with human A53T mutant α -syn overexpression in the striatum. Representative pictures and surface quantification of GFAP immunostaining. Scale bar = 100µm.



Supplementary Figure 2. Virus transduction in the Substantia Nigra of TFEB-injected mice. Representative images of virus transduction in the SN of control and TFEB-injected mice using immunostaining against HA tag for CMVie/hSyn-mTFEB group and Flag tag for MBP-mTFEB group. Scale bars = 200µm, 20µm (inset).

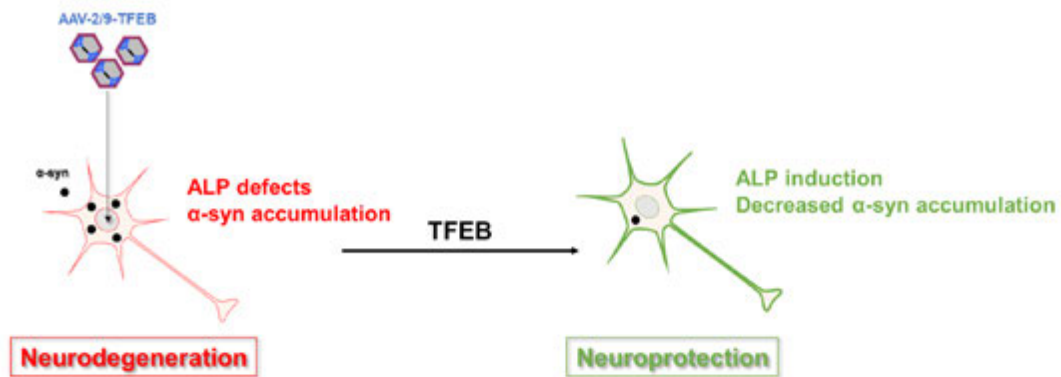


Supplementary Figure 3. TFEB-mediated neurotrophic effect *in vitro* in the dendritic length. (A) Illustrative images using β 3-tubulin (green) and TFEB (red) antibodies in BE(2)-M17 human dopaminergic neuroblastoma cells treated with 5 μ M retinoic acid for 24h and transfected or not with TFEB-encoding plasmids for 48h. (B) Quantification of the dendritic length in non-transfected cells (UT, n= 71, white bar), CMVie/hSyn-mTFEB (n = 83, blue bar) and MBP-TFEB-transfected cells (n= 88, green bar) expressed in arbitrary unit (A.U). Scale bar = 10 μ m. (C) Representative images of Akt and phosphorylated Akt (P-Akt) immunoblotting in the ipsilateral SN of Control, CMVie/hSyn-mTFEB-injected and MBP-mTFEB- injected WT and PLP mice. (D-E-F) Quantification of Akt (D), Phospho-Akt (E) and the ratio P-Akt/Akt (F) protein levels expressed in percentage of WT control mice in the ipsilateral SN of Control, CMV-mTFEB-injected and MBP-mTFEB-injected WT and PLP mice. n=5 per group. White bars: control; blue bars: CMVie/hSyn-mTFEB-HA; green bars: MBP-mTFEB-3xFlag. Data represent mean +/- SEM. In B, comparisons were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. *p< 0.05 compared to control non-transfected cells. In D-E-F, comparisons were made using Two-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. *p< 0.05 compared to Control PLP animals. n.s: not significant.

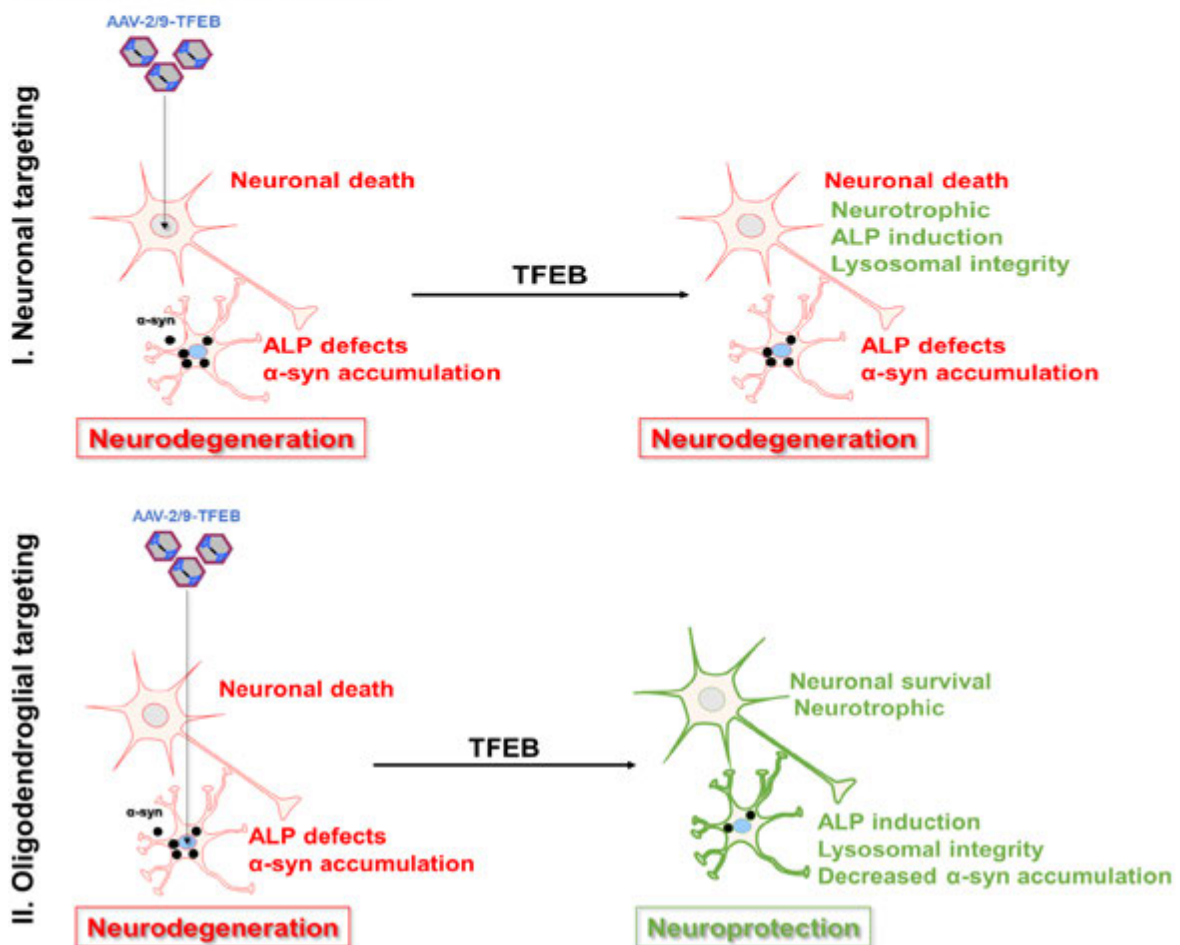


Supplementary Figure 4. Gene expression analysis of *Tfeb* lysosomal targets in the Substantia Nigra of TFEB-injected PLP mice. mRNA levels measured by quantitative PCR in SN patches of control and TFEB-injected PLP mice of *Mcoln1* (A), *Map1lc3a* (B), *Lamp2b* (C), *CtsB* (D) and *CtsF* (E) genes. $n=4-5$ per group. White bars: Control; Blue bars: CMVie/hSyn-mTFEB-HA, Green bars: MBP-mTFEB-3xFlag. Data represent mean \pm SEM. Comparisons were made using One-Way ANOVA and Tukey's correction for multiple comparisons. * $p < 0.05$ compared to control PLP mice.

A. Parkinson's Disease



B. Multiple system atrophy



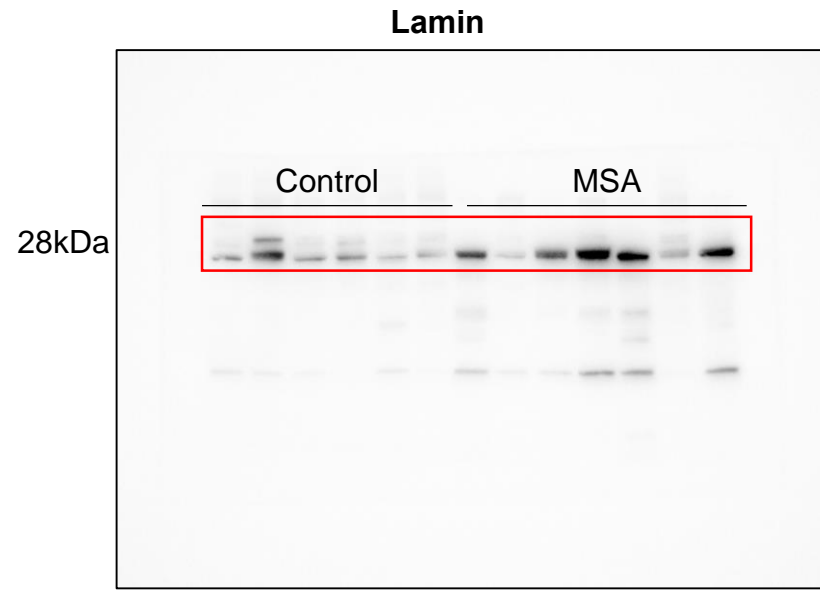
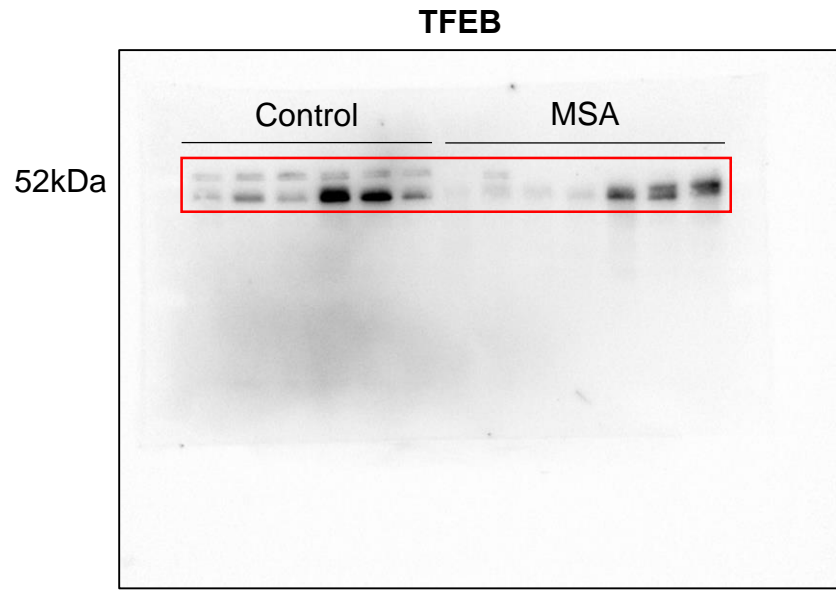
Supplementary Figure 5. Cell-specific targeting of TFEB overexpression as a therapeutic strategy to prevent neurodegeneration in synucleinopathies. (A) Overexpressing TFEB in dopaminergic neurons led to neuroprotective effects associated with decreased α -synuclein levels linked to ALP enhancement in a rat model of Parkinson's Disease. (B) (I.) Overexpressing TFEB in dopaminergic neurons induces neurotrophic effects but not neuroprotective effects in MSA mice model. (II.) Overexpressing TFEB in oligodendrocytes induces neurotrophic effects but also neuroprotective effects associated with decreased α -synuclein levels and ALP enhancement in a mice model of MSA.

Supplementary Table 1. Demographics of healthy control subjects and MSA patients obtained from GIE Neuro-CEB BB-0033-00011 used in this study. PMI: post-mortem interval, M: male, F: female, MSA-p: Multiple system atrophy, parkinsonian type.

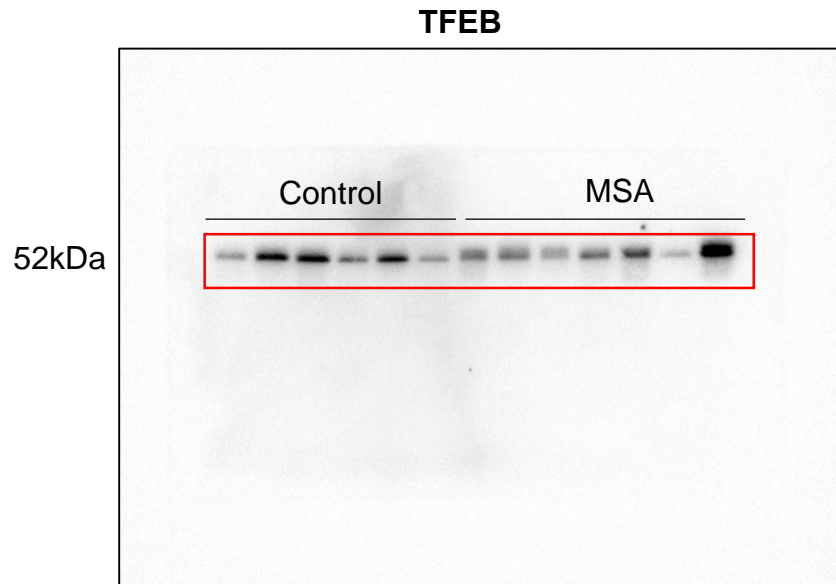
Numbers	Diagnosis	Age (y)	Sex	PMI (h)	Tissue	
1	Normal control	84	M	15.5	Putamen	Frontal Cortex
2	Normal control	79	M	Nd	Putamen	Frontal Cortex
3	Normal control	69	M	6	Putamen	Frontal Cortex
4	Normal control	83	F	21	Putamen	Frontal Cortex
5	Normal control	80	M	4	Putamen	Frontal Cortex
6	Normal control	78	M	23	Putamen	Frontal Cortex
7	MSA-p	54	M	5.25	Putamen	Frontal Cortex
8	MSA-p	64	F	6.5	Putamen	Frontal Cortex
9	MSA-p	60	F	Nd	Putamen	Frontal Cortex
10	MSA-p	57	F	7	Putamen	Frontal Cortex
11	MSA-p	75	M	72	Putamen	Frontal Cortex
12	MSA-p	78	F	48	Putamen	Frontal Cortex
13	MSA-p	77	M	39	Putamen	Frontal Cortex

Full unedited gel for Figure 2A

Nuclear fraction

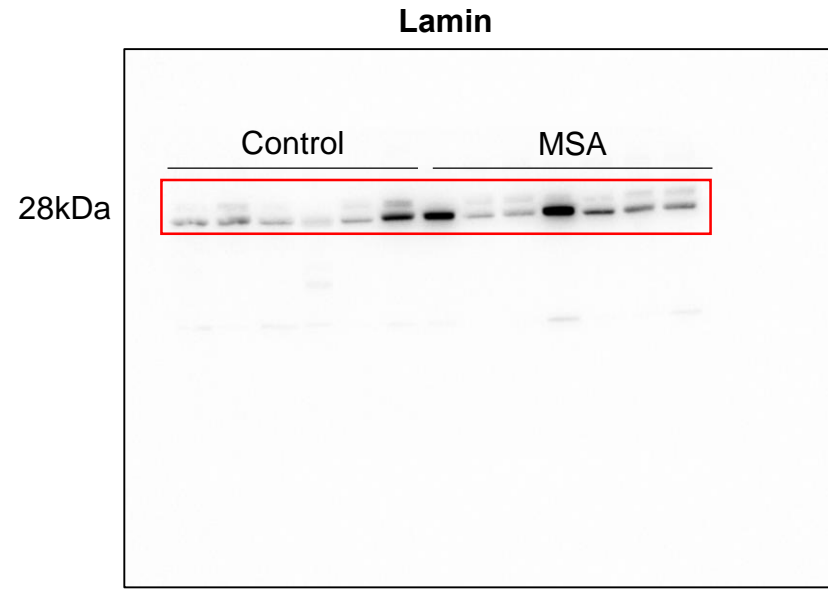
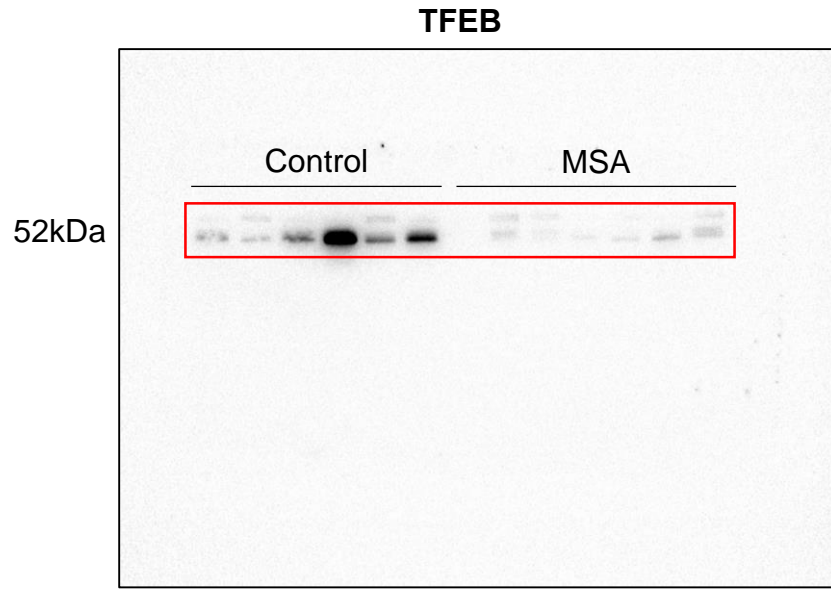


Cytosolic fraction

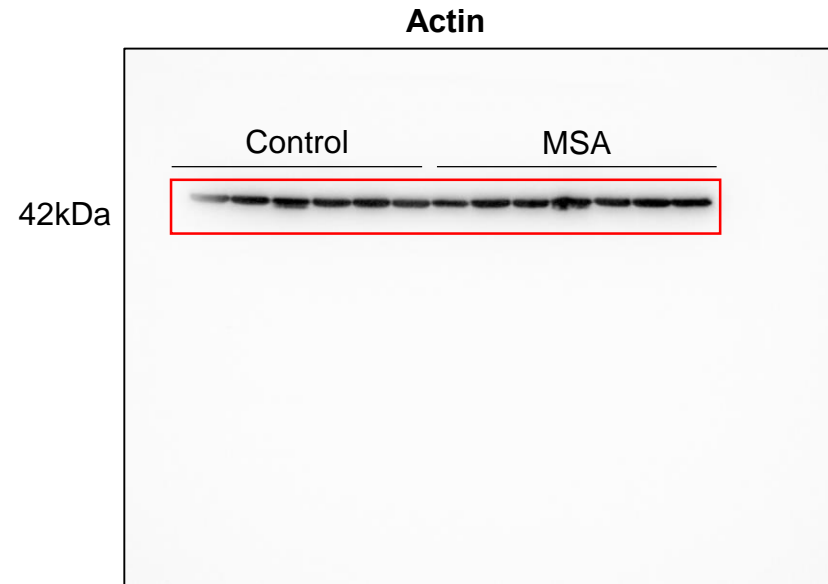
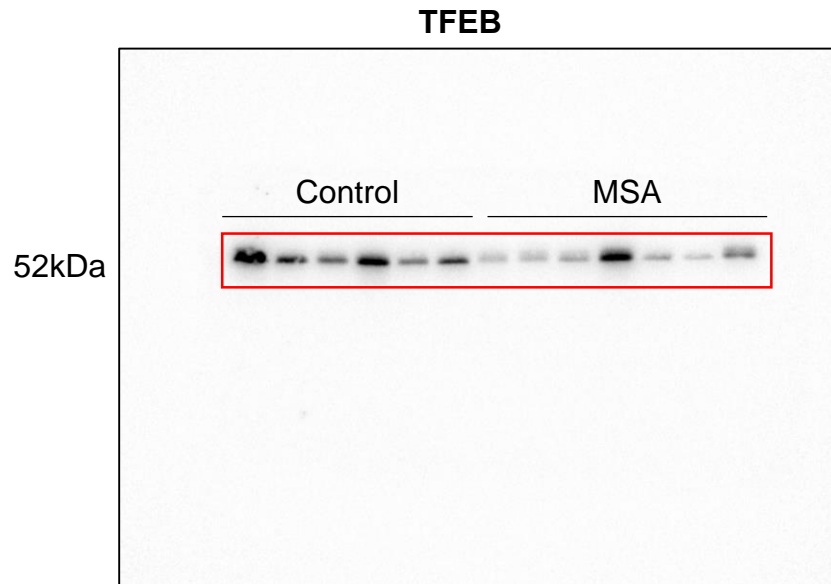


Full unedited gel for Figure 2C

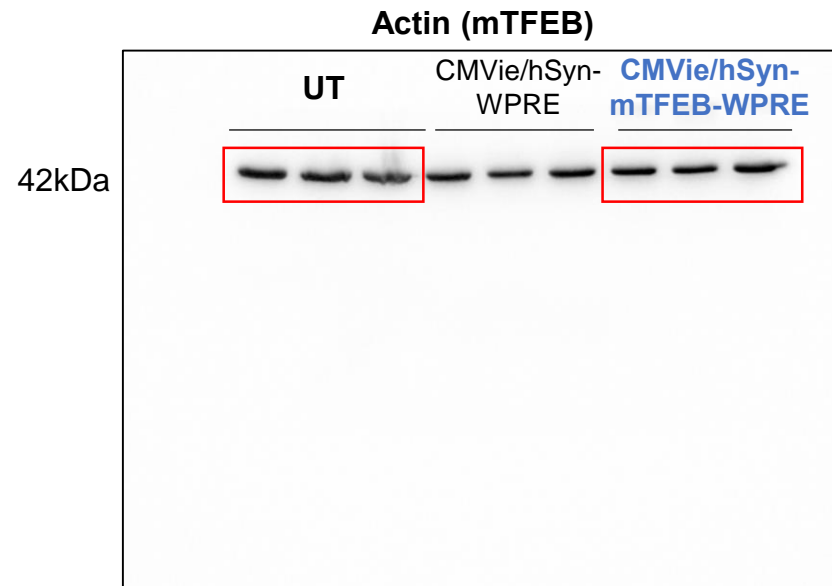
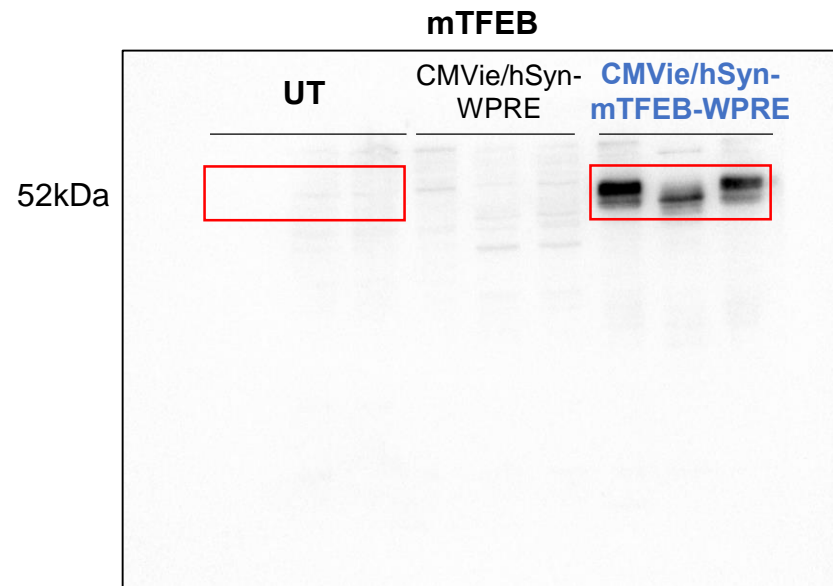
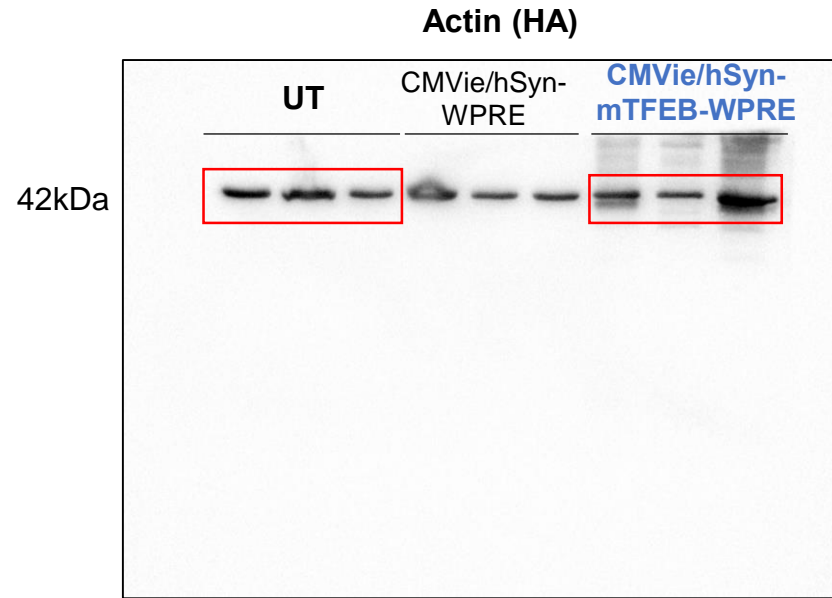
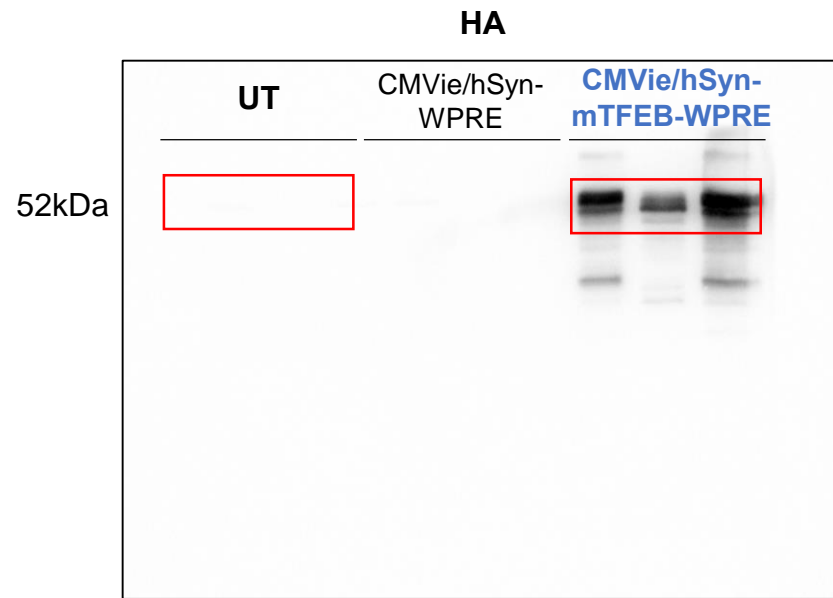
Nuclear fraction



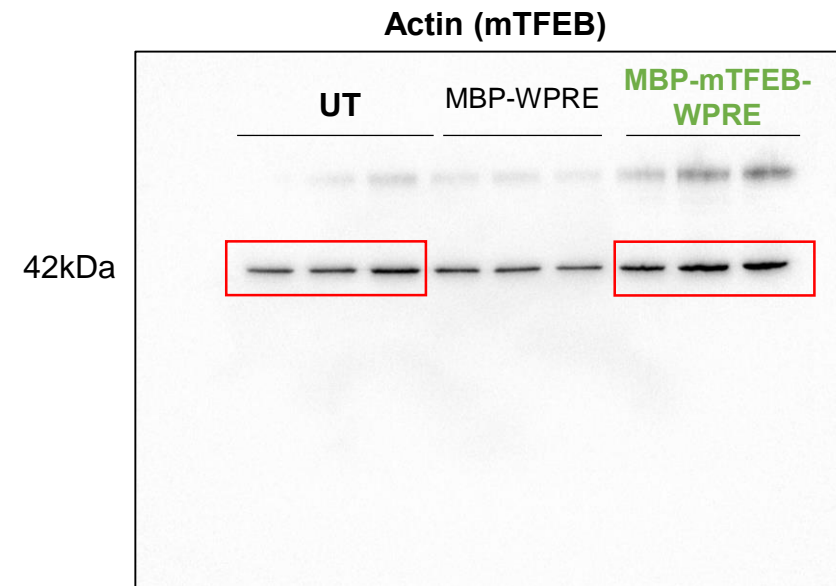
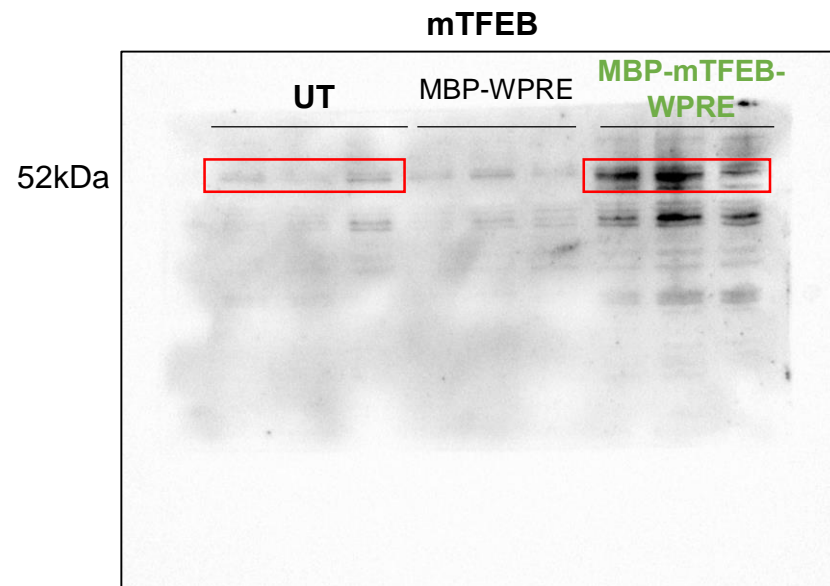
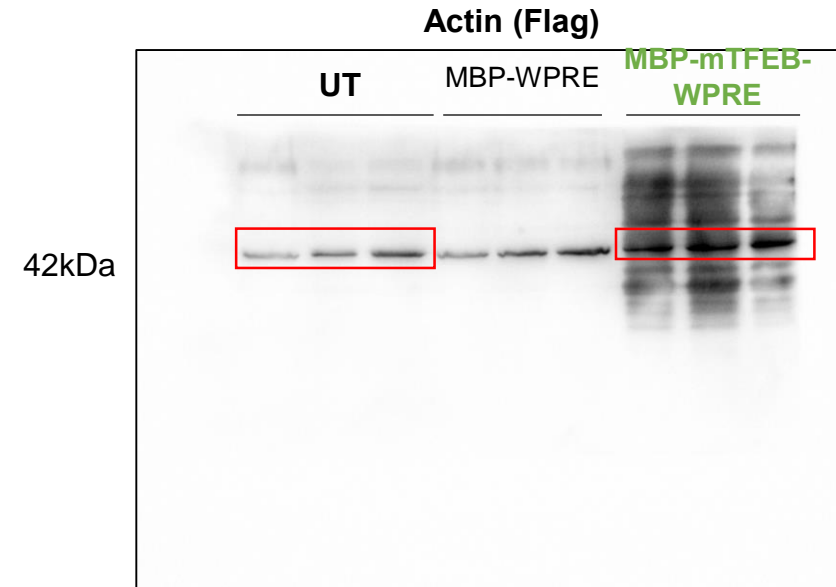
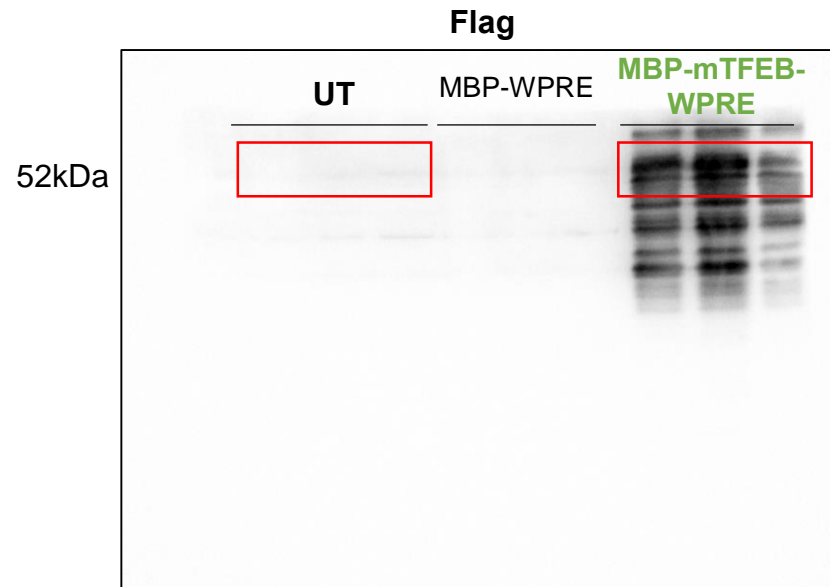
Cytosolic fraction



Full unedited gel for Figure 3A

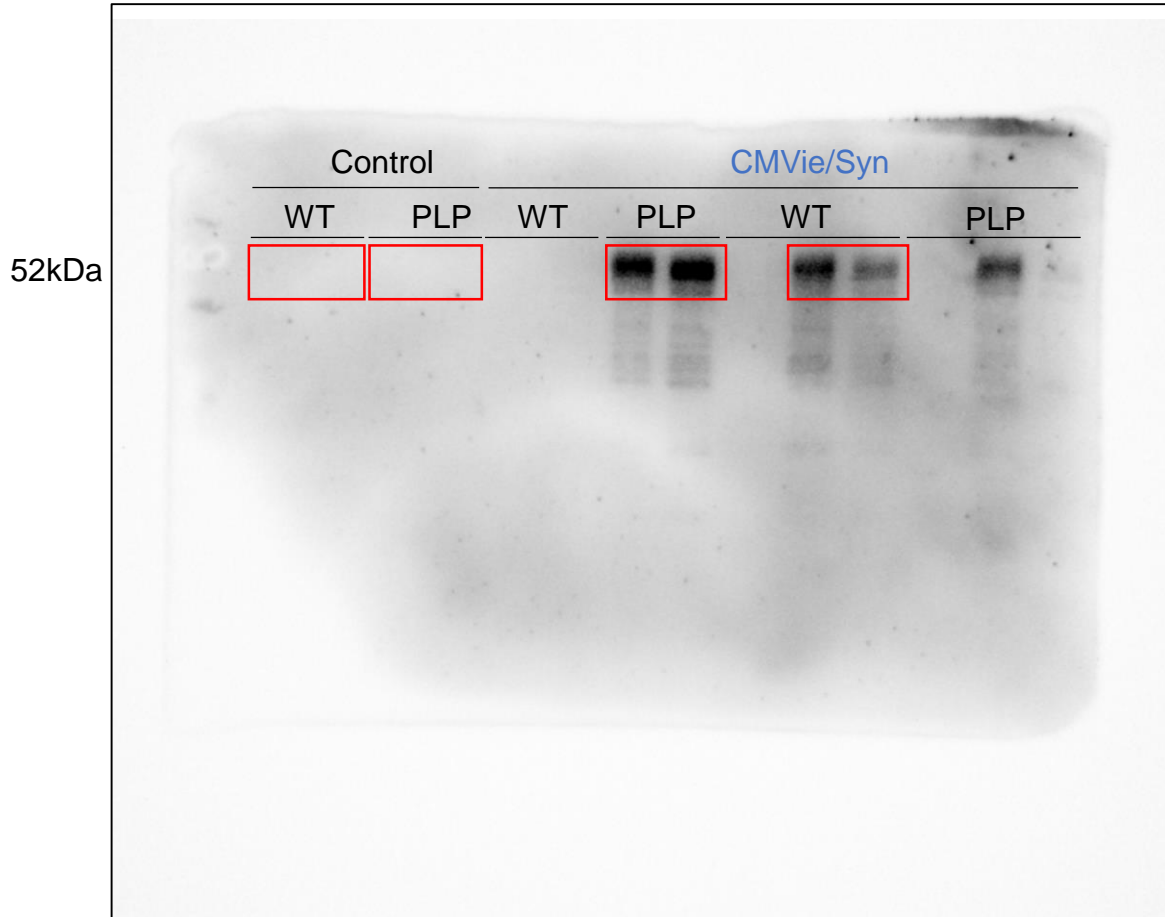


Full unedited gel for Figure 3B

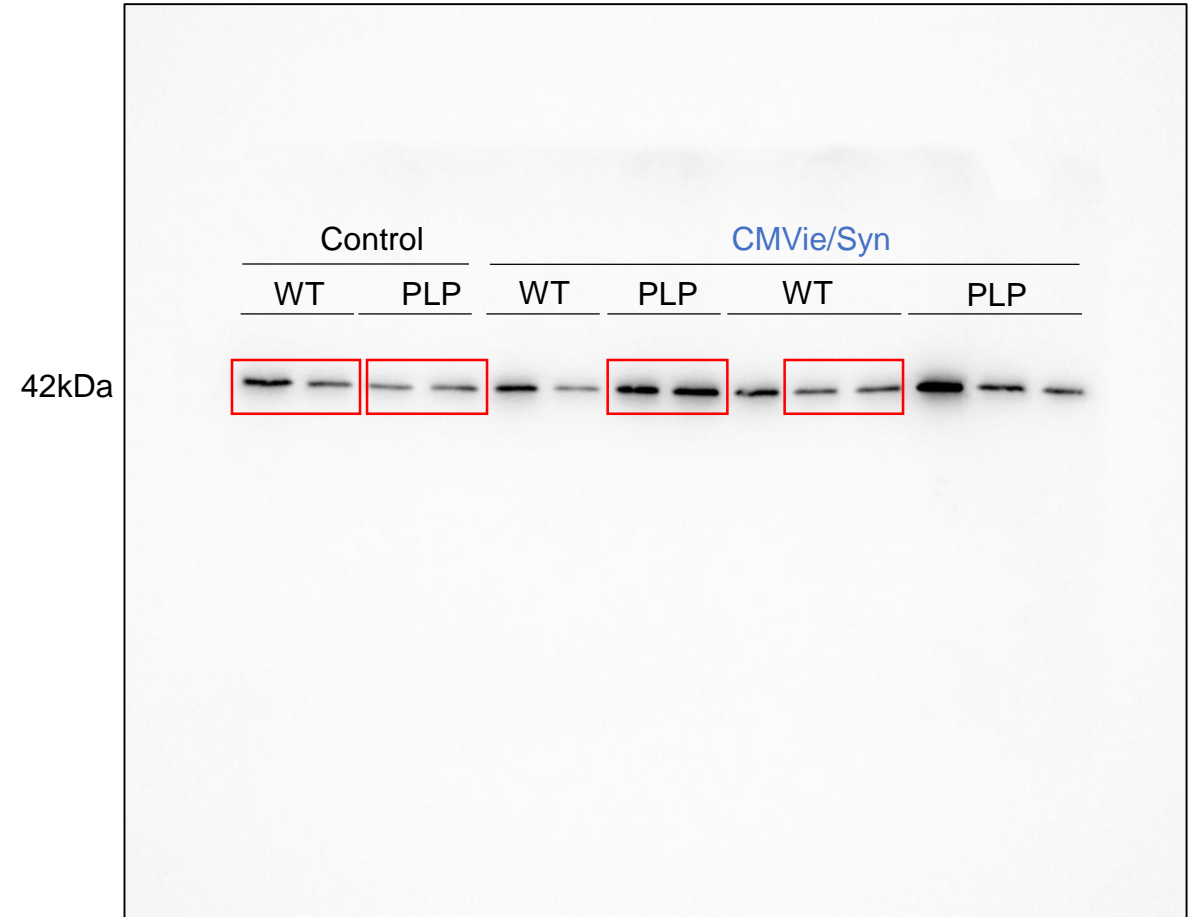


Full unedited gel for Figure 3D

HA



Actin

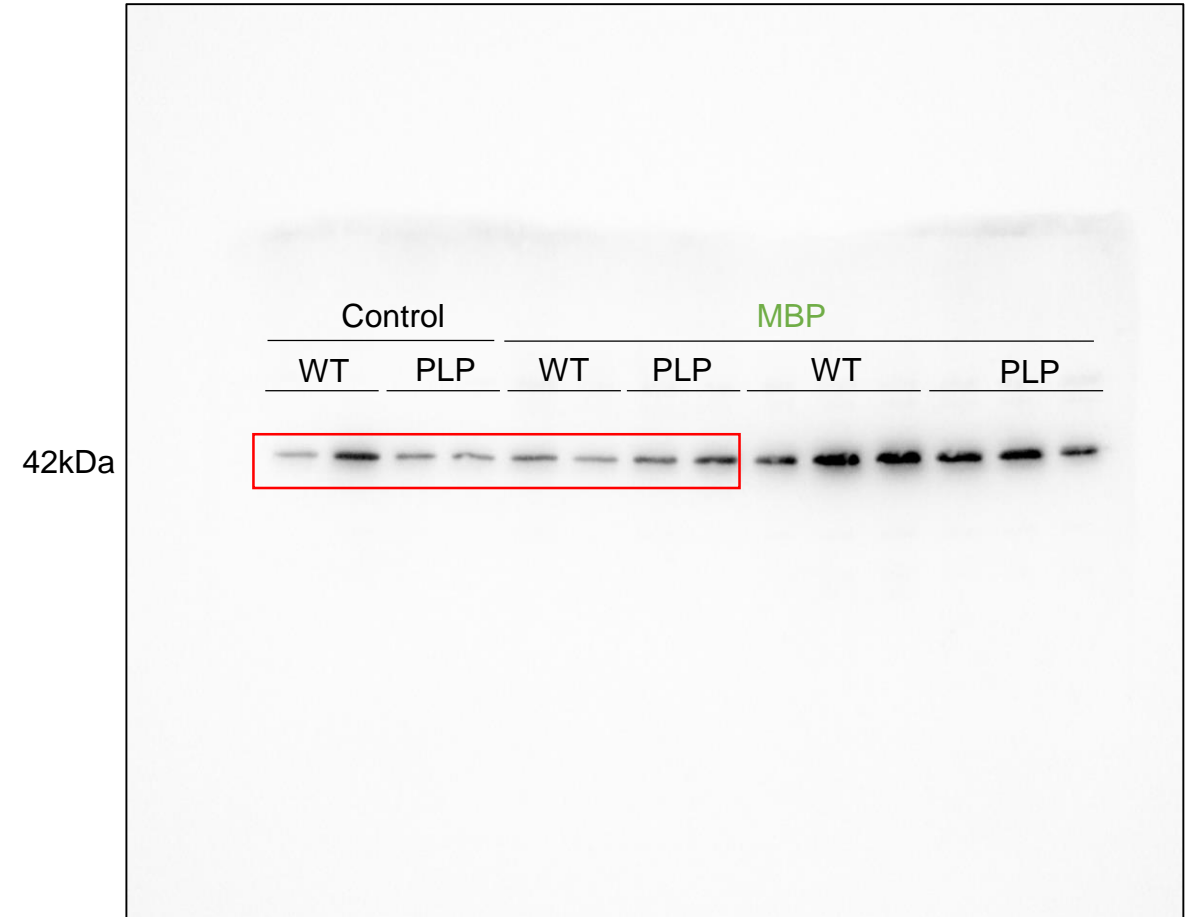


Full unedited gel for Figure 3F

Flag

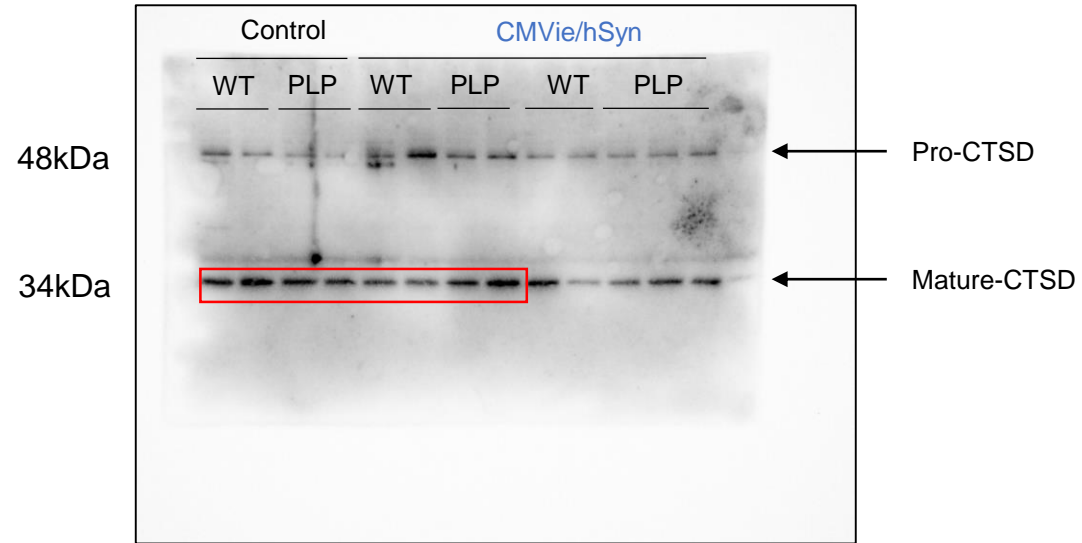


Actin

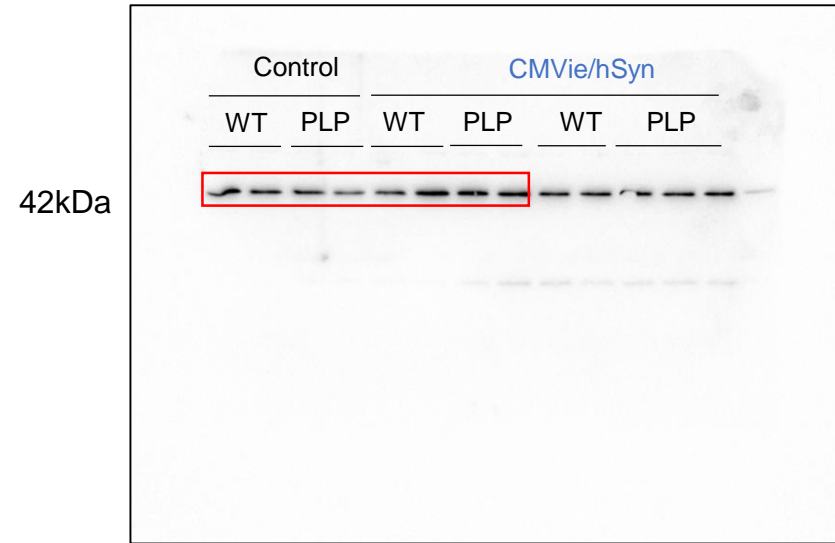


Full unedited gel for Figure 8B

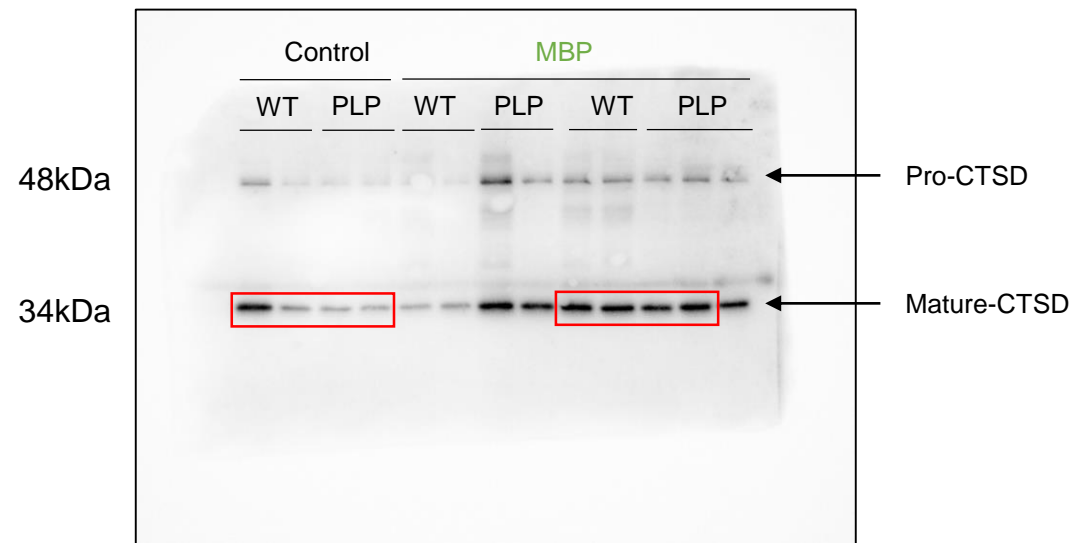
CTSD



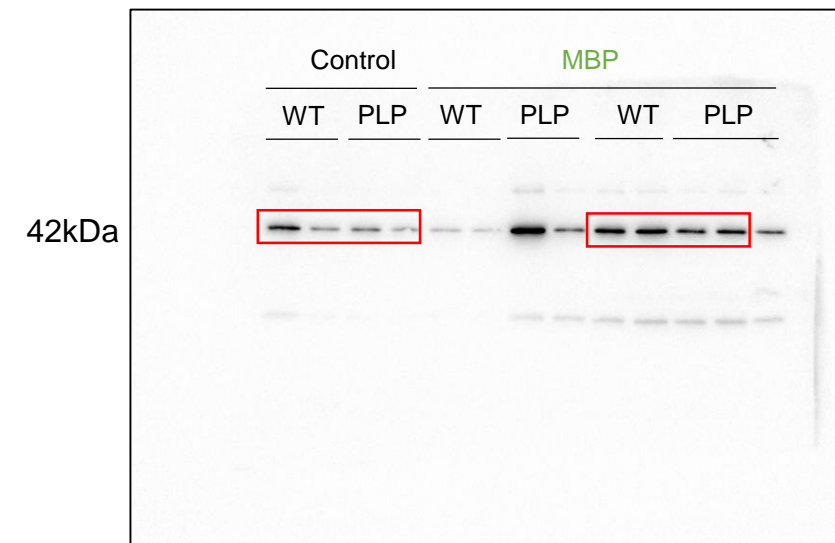
Actin



CTSD



Actin



Full unedited gel for Supplemental Figure S3C

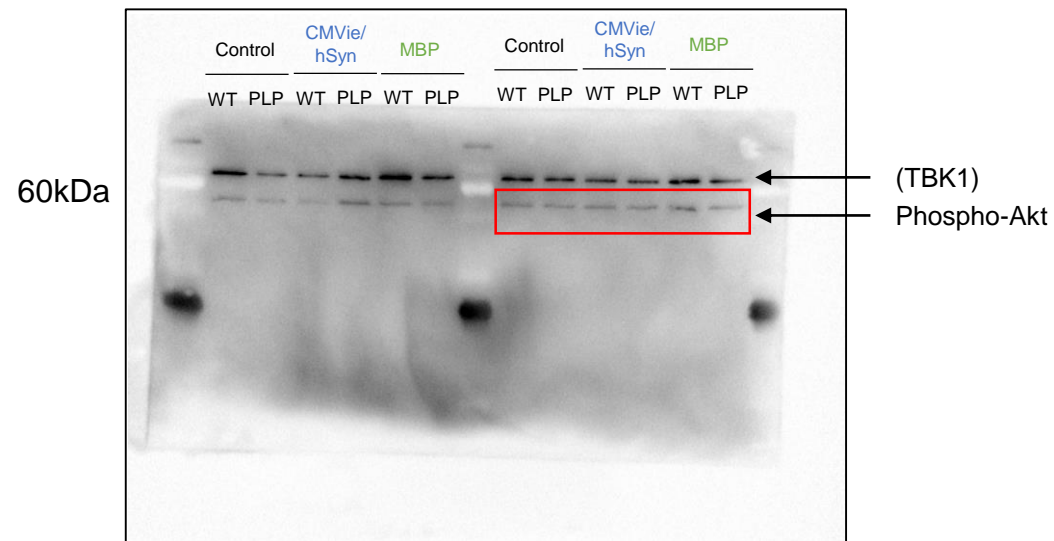
Akt



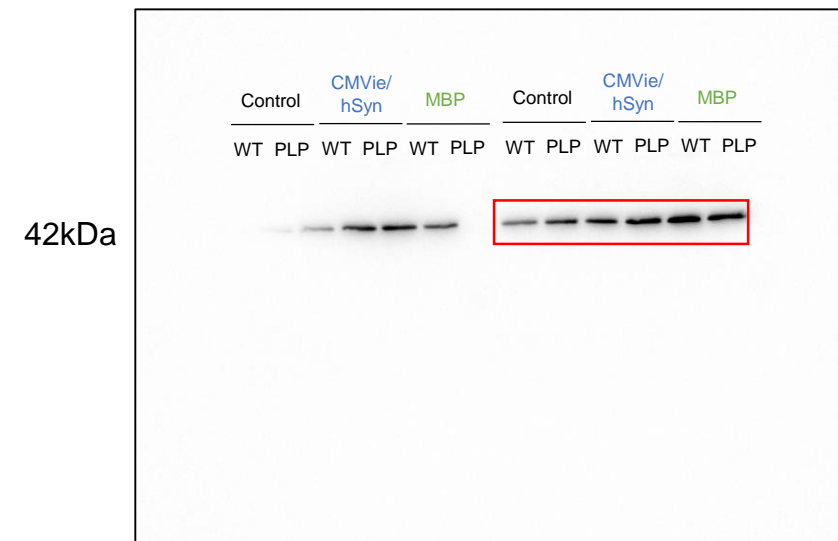
Actin (Akt)



Phospho-Akt



Actin (Phospho-Akt)



Projet 7 : Augmenter la dégradation de la protéine α -synucléine par induction de l'autophagie via le tréhalose

1. Contexte de l'étude :

Comme démontré précédemment, induire l'activation de l'autophagie s'avère une stratégie thérapeutique efficace pour toutes les synucléinopathies. Nous avons donc cherché à étudier d'autres cibles potentielles, autre que TFEB, afin d'induire l'autophagie dans le système nerveux de modèles de synucléinopathie. Nous nous sommes alors concentrés sur un sucre, le tréhalose.

Le tréhalose est un disaccharide présent seulement chez les invertébrés, notamment les plantes et les levures (**Richards *et al.*, Food and Chemical Toxicology, 2002**). Les mammifères ont perdu au cours de l'évolution la capacité de synthèse de ce sucre (**Argüelles, Journal of Molecular Evolution, 2014**). Deux enzymes, rassemblées au sein de l'opéron tréhalose OtsB/A, permettent la production du tréhalose à partir du glucose : (i) la tréhalose-6-phosphate synthase (OtsA) qui couple l'UDP-Glucose et le glucose-6-phosphate pour produire la liaison α,α -1,1-glucoside entre les deux molécules de glucose formant le tréhalose-6-phosphate et (ii) la tréhalose-6-phosphate phosphatase (OtsB) qui permet d'enlever le résidu phosphate pour obtenir la molécule de tréhalose (**Figure 42**).

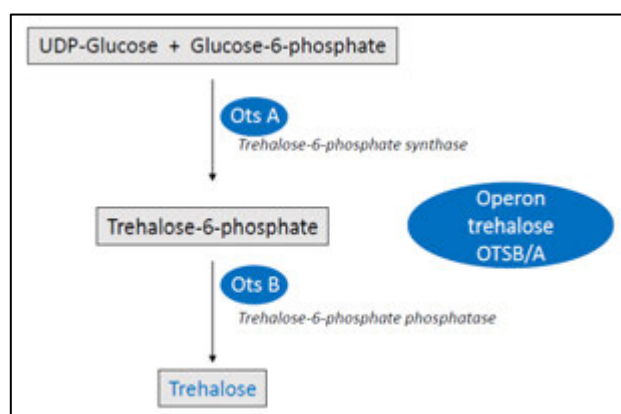


Figure 42 : Réactions enzymatiques de la catalyse du sucre tréhalose.

Il a été montré qu'une administration de tréhalose par la nourriture chez des souris atteintes de stéatose hépatique non alcoolique induit l'autophagie dans les cellules hépatiques, permettant de réduire l'accumulation des triglycérides associée à cette pathologie (**DeBosch *et al.*, Science signaling, 2016**). Le tréhalose inhiberait l'import de glucose par le récepteur membranaire cellulaire SLC2A, mimant alors une condition de famine cellulaire, induisant alors l'activation des voies AMPK et ULK1 permettant l'activation autophagique de manière mTOR-indépendante (**DeBosch *et al.*, Science signaling, 2016**). Cette activation ne se traduit pas seulement par une

augmentation de la biogénèse autophagosomale mais également par une augmentation de l'activité lysosomale et donc de la clairance des autophagosomes, permettant une meilleure clairance des protéines mal-conformées (**Lee *et al.*, Cell death & disease, 2018**).

De plus, le tréhalose s'avère être une molécule chaperonne chimique, stabilisant les protéines cellulaires par une interaction directe protéine-tréhalose (**Richards *et al.*, Food and Chemical Toxicology, 2002**).

Son effet neuroprotecteur, de par son induction autophagique et sa propriété chaperonne, a été démontré dans de nombreux modèles de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (**Du *et al.*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013**), les maladies à prions (**Aguib *et al.*, Autophagy, 2009**), la sclérose amyotrophique latérale (**Castillo *et al.*, Autophagy, 2013, Rusmini *et al.*, Autophagy, 2019**), les démences fronto-temporales (**Holler *et al.*, Molecular neurodegeneration, 2016**) ou la maladie de Huntington (**Tanaka *et al.*, Nature Medicine, 2004**).

Ainsi, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet du tréhalose dans un modèle rat de la maladie de Parkinson, le rat qui exprime l' α -syn humaine mutée A53T dans les neurones dopaminergiques de la substance noire. Pour permettre la production du tréhalose dans ce modèle mammifère, nous avons utilisé un vecteur viral de type AAV permettant l'expression des deux enzymes de catalyse du tréhalose (i.e. OtsA et OtsB, sous un même promoteur neuronal).

2. Objectif de l'étude :

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'effet de l'induction autophagique via la production de tréhalose chez un modèle de la maladie de Parkinson.

3. Design expérimental :

Vecteurs viraux :

Trois virus adéno-associés ont été produits pour cette étude :

- ❖ ssAAV2/9-CMVie/hSynP-A53ThSyn-WPRE-pA : exprime l' α -syn humaine mutée A53T sous promoteur neuronal – Titre viral : $1,82 \cdot 10^{13}$ gcp/mL.
- ❖ ssAAV2/9-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA : exprime les enzymes de catalyse du tréhalose OtsA et OtsB sous le même promoteur neuronal – Titre viral : $7,1 \cdot 10^{13}$ gcp/mL.
- ❖ ssAAV2/9-CMVie/hSynP-WPRE-pA : vecteur contrôle ne contenant aucun gène. Titre viral : $2,06 \cdot 10^{13}$ gcp/ml

Validation fonctionnelle in vitro

Des cellules de neuroblastome humain BE(2)-M17 (ATCC, #CRL-2267) sont mises en culture dans un milieu OPTIMEM (Gibco, ThermoFisher, USA), supplémenté avec 10% de sérum fœtal de bovin et 1% de Streptomycine/Penicilline (Sigma). Les cellules M17 sont ensuite ensemencées dans une plaque 12 puits jusqu'à atteindre 80% de confluence.

Validation du kit trehalose : Les cellules M17 dans les plaques 12 puits sont traitées avec 0, 4, 10, 20µg de tréhalose pendant 24h. Les cellules sont ensuite récupérées et lysées dans 100µL de tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate), couplé à un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche Diagnostics). La quantité de tréhalose dans le lysat est ensuite mesurée à l'aide du kit de mesure du tréhalose (Mégazyme, K-TREH).

Validation fonctionnelle du plasmide pAAV-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA : Les cellules M17 ensemencées dans les plaques 12 puits sont transfectées avec le plasmide contenant l'opéron tréhalose à 1,6µg d'ADN utilisant le PEI pour transfection pendant 4 heures. Ensuite, le milieu est changé et les cellules sont maintenues pendant 24 heures à 37°C/5%CO₂. En parallèle, les cellules sont traitées avec 20µg de tréhalose comme contrôle positif. Les cellules sont ensuite récupérées et lysées dans 100µL de tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate), couplé à un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche Diagnostics). La quantité de tréhalose dans le lysat est ensuite mesurée à l'aide du kit de mesure du tréhalose (Mégazyme, K-TREH). En parallèle, les cellules transfectées avec le plasmide contenant l'opéron tréhalose sont traitées avec le LysoTracker et soumis à une analyse par FACS afin de mesurer l'intensité du LysoTracker et donc l'induction lysosomale.

Injection stéréotaxique virale :

Vingt-trois rat adultes mâles Sprague Dawley (Charles Rivers) sont utilisés pour ce projet. Les animaux sont injectés par stéréotaxie unilatéralement dans la substance noire pars compacta droite aux coordonnées suivantes : antérieur -2,9, latéral -1,3, profondeur -4,5 (**Table 4**). Le volume total d'injection est de 4µL. L'hémisphère gauche constitue la condition contrôle. Toutes les procédures expérimentales précédentes ont été approuvées par le Comité d'éthique animale de l'Université de Bordeaux. Les animaux ont été mis à mort dix-sept semaines après la chirurgie. Les cerveaux ont été prélevés puis congelés après fixation pour une analyse histologique.

Groupe	Nombre d'animaux	Vecteur viral injecté
Ctrl	4	ssAAV2/9-CMVie/hSynP-WPRE-pA
OTS B/A	5	ssAAV2/9-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA
Syn	6	ssAAV2/9-CMVie/hSynP-A53T-hSyn-WPRE-pA
Syn + OTS B/A	7	ssAAV2/9-CMVie/hSynP-A53T-hSyn-WPRE-pA + ssAAV2/9-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA

Table 5 : Groupes d'expériences associés à l'étude.

Analyse immunohistochimique des cerveaux en post-mortem

Neurodégénérescence : la perte neuronale dopaminergique est évaluée grâce à un marquage tyrosine hydroxylase (TH, EP1532Y, abcam, #ab137869), suivi d'un comptage par stéréologie des neurones de la substance noire pars compacta positif pour la TH ainsi qu'une analyse par densité optique de la quantité des fibres dopaminergiques au sein du striatum.

Synucléinopathie : l'accumulation de l' α -syn est évaluée dans la substance noire et le striatum des animaux. Brièvement, des sections de striatum (antérieur, médian, postérieur) et de la substance noire sont incubées avec l'anticorps primaire ciblant l' α -syn humaine totale (Invitrogen, Syn211, #32-8100).

4. Résultats :

Afin de valider la fonctionnalité du plasmide pAAV-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA, nous avons évalué la quantité de tréhalose produite après transfection du plasmide contenant ces deux gènes codant pour les deux enzymes de l'opéron tréhalose à l'aide d'un kit commercial de dosage du tréhalose.

Nous avons tout d'abord validé l'utilisation du kit en traitant directement les cellules avec 0, 4, 10, 20, 40 et 80 μ g de tréhalose (**Figure 43A**). Nous avons confirmé la détection du tréhalose à l'aide du kit avec l'apparition d'un plateau de saturation atteint dès un traitement avec 4 μ g de tréhalose. Nous avons ensuite évalué la quantité de tréhalose produite par les cellules M17 à 24h post-transfection avec le plasmide pAAV-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA à l'aide du kit de mesure du tréhalose (**Figure 43B**). Exprimer l'opéron tréhalose permet une production de tréhalose d'environ 0,1 μ g/ μ L au niveau intracellulaire. Nous avons ainsi validé la fonctionnalité de notre plasmide qui permet la réaction catalytique de production du tréhalose intracellulaire après expression des deux enzymes.

Nous avons également mis en évidence une augmentation du signal d'intensité du LysoTracker 24h post-transfection avec le plasmide pAAV-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA (**Figure 43C**). Ce résultat valide la production de tréhalose et l'effet escompté d'induction de biogénèse lysosomale après expression de l'opéron tréhalose *in vitro*.

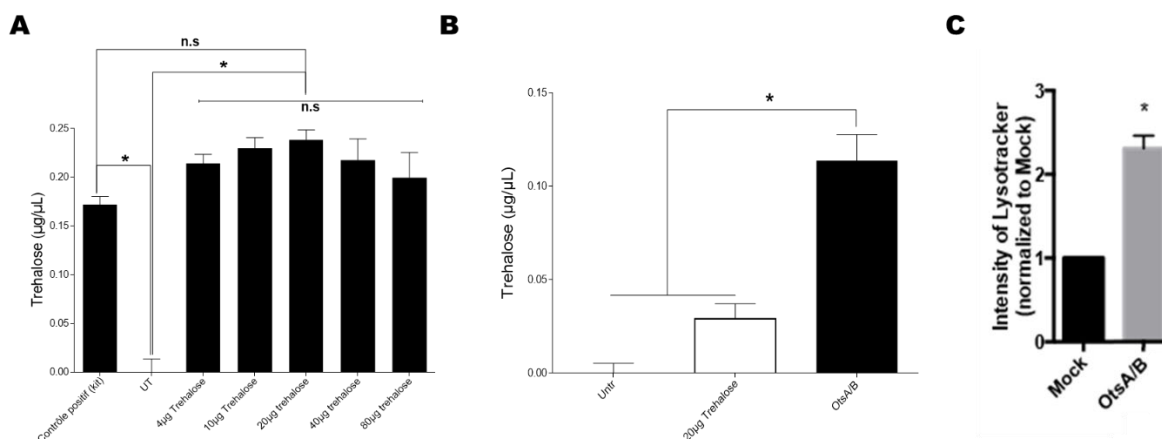


Figure 43 : Validation fonctionnelle de l'expression du transgène contenant l'opéron tréhalose OtsB/A *in vitro*. (A) Mesure de la concentration de tréhalose ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) produit par les cellules M17 traitées pendant 24h avec 0, 4, 10, 20, 40 et 80 μg de tréhalose. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-Way ANOVA. (B) Mesure de la concentration de tréhalose ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) produit par les cellules M17 transfectées avec le plasmide pAAV-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA (OtsA/B) ou traitées avec 20 μg de tréhalose pendant 24h. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA. (C) Mesure par FACS de l'intensité du LysoTracker dans les cellules M17 transfectées avec le plasmide pAAV-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA (OtsA/B) ou non- transfectées pendant 24h. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un t-test non-paramétrique. Chaque condition représente une moyenne de triplicats. * $p < 0.05$ par rapport à la condition non traitées. n.s : non-significatif.

Nous nous sommes ensuite concentrés à évaluer l'effet de la production du tréhalose *in vivo*, dans un modèle rat viral à base d' α -syn mutée (A53T-hSyn) de la maladie de Parkinson, après co-injection du vecteur viral exprimant l'opéron tréhalose sous un promoteur neuronal dans la substance noire des animaux.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à mesurer l'effet de la production du tréhalose sur la neurodégénérescence nigro-striée (**Figure 44**). Au niveau de la substance noire, exprimer l'opéron tréhalose (groupe OTS) n'induit pas d'effet toxique significatif concernant le nombre de neurones dopaminergiques, comparé au groupe contrôle (**Figure 44B**). Le modèle A53T-hSyn présente une perte dopaminergique significative de l'ordre de 40% au niveau ipsilatéral (**Figure 44B**). La surexpression de l'opéron tréhalose (groupe OTS) dans ce modèle diminue le pourcentage de perte dopaminergique mais de manière non statistiquement significative (**Figure 44C**).

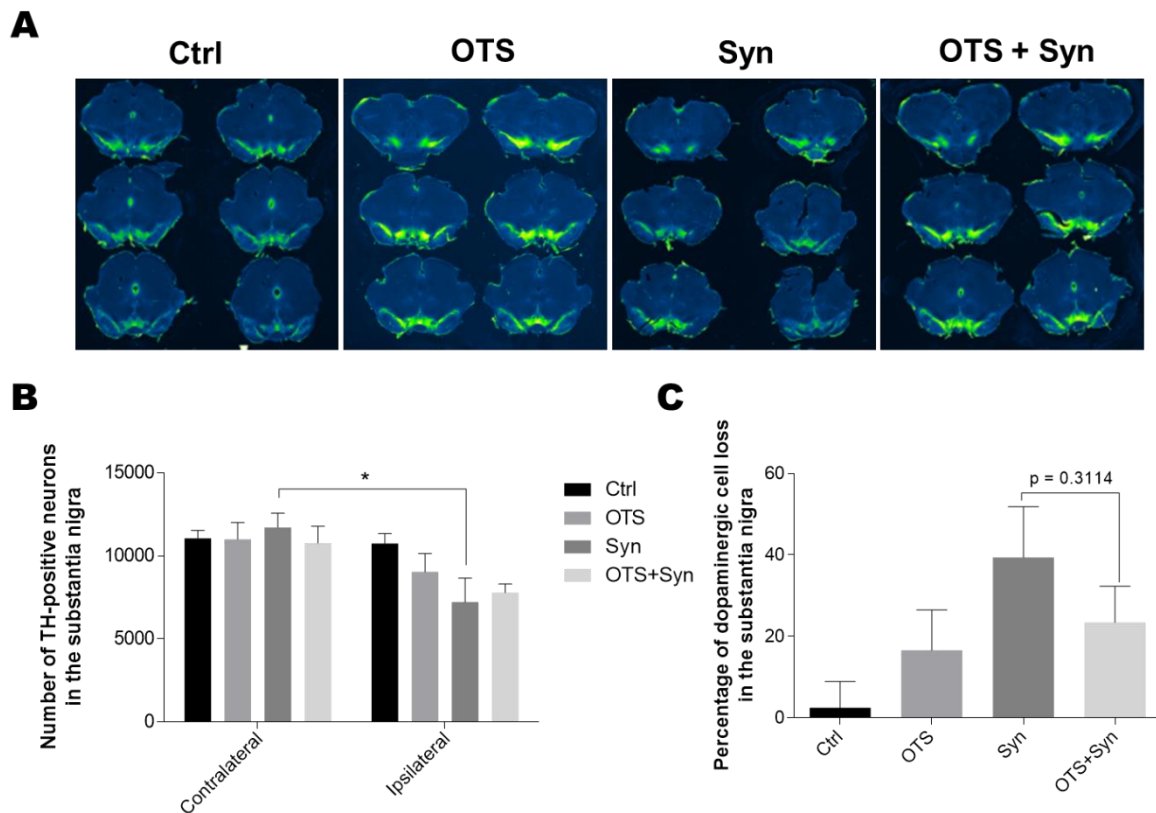


Figure 44 : Evaluation de l'effet de la production du tréhalose sur la neurodégénérescence dans la substance noire du modèle rat A53T-hSyn (A) Images illustratives et (B) quantification du nombre de neurones TH-positifs dans la substance noire contralatérale (gauche) et ipsilatérale (droit) des rats inoculés. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test two-way ANOVA. (C) Pourcentage de perte neuronale observée dans la substance noire des rats inoculés entre les différents groupes expérimentaux. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA. * $p < 0,05$. n.s : non-significatif. *Ctrl* : animaux ayant reçu le vecteur viral vide ssAAV2/9-CMVie/hSynP-WPRE-pA (n=4) ; *OTS* : animaux ayant reçu le vecteur viral exprimant l'opéron tréhalose ssAAV2/9-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA (n=5) ; *Syn* : animaux ayant reçu le vecteur viral exprimant l' α -syncléine humaine mutée A53T ssAAV2/9-CMVie/hSynP-A53ThSyn-WPRE-pA (N=6) ; *OTS+Syn* : animaux ayant reçu les vecteurs viraux exprimant l' α -syncléine humaine mutée A53T ssAAV2/9-CMVie/hSynP-A53ThSyn-WPRE-pA et l'opéron tréhalose ssAAV2/9-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA (n=8).

Au niveau striatal, l'injection du vecteur viral exprimant l'opéron tréhalose dans les rats sauvages entraîne un effet toxique avec une perte significative des fibres dopaminergiques du striatum (**Figure 45A,C**). Les animaux ayant reçu l'injection virale de l' α -syn humaine mutée A53T montre également une perte des fibres dopaminergiques striatales, une des caractéristiques de ce modèle de la maladie de Parkinson (**Figure 45**). L'expression de l'opéron tréhalose dans les animaux modèles A53T-hSyn n'induit aucun effet neuroprotecteur au niveau des fibres dopaminergiques ipsilatérales du striatum (**Figure 45C**).

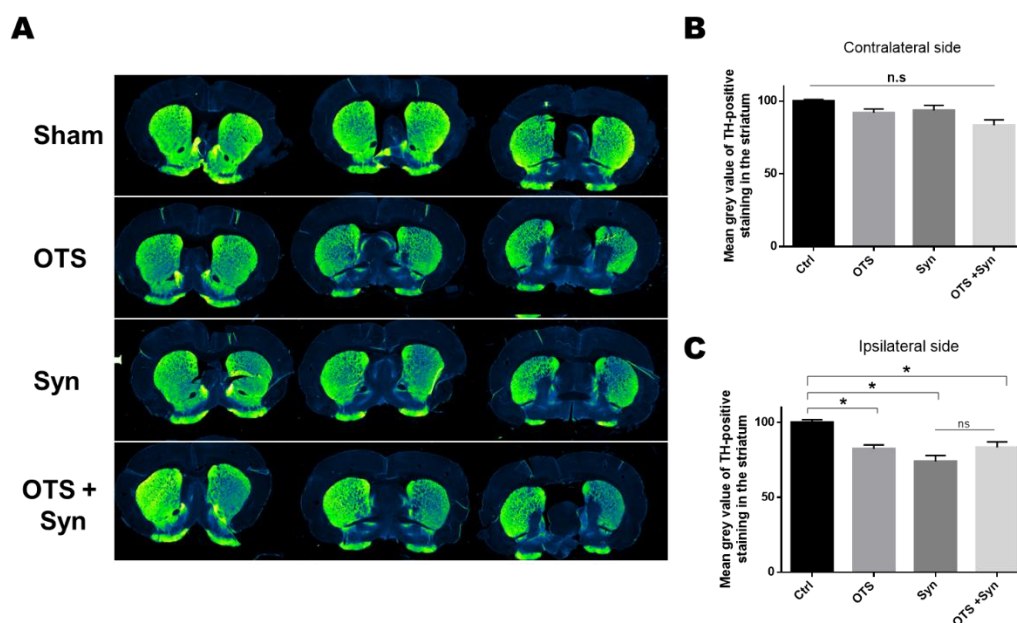


Figure 45 : Evaluation de l'effet de la production du tréhalose sur la neurodégénérescence dans le striatum du modèle rat A53T-hSyn (A) Images illustratives et **(B-C)** quantification de l'immunomarquage TH-positif dans le striatum contralatéral (gauche, **B**) et ipsilatéral (droit, **C**) des rats inoculés. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA. * $p < 0,05$. n.s : non-significatif. *Ctrl* : animaux ayant reçu le vecteur viral vide ssAAV2/9-CMVie/hSynP-WPRE-pA (N = 4) ; *OTS* : animaux ayant reçu le vecteur viral exprimant l'opéron tréhalose ssAAV2/9-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA (N = 5) ; *Syn* : animaux ayant reçu le vecteur viral exprimant l' α -syncléine humaine mutée A53T ssAAV2/9-CMVie/hSynP-A53ThSyn-WPRE-pA (N=6) ; *OTS+Syn* : animaux ayant reçu les vecteurs viraux exprimant l' α -syncléine humaine mutée A53T ssAAV2/9-CMVie/hSynP-A53ThSyn-WPRE-pA et l'opéron tréhalose ssAAV2/9-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA (N=8).

Ces résultats suggèrent que la production de tréhalose via l'expression des enzymes catalytiques contenues dans l'opéron tréhalose du vecteur viral injecté n'induit qu'une faible neuroprotection, non-significative, au niveau des neurones dopaminergiques nigraux sans effet neuroprotecteur sur les fibres dopaminergiques striatales dans le modèle rat A53T-hSyn de la maladie de Parkinson.

Nous nous sommes ensuite intéressés à évaluer l'effet de la production du tréhalose sur la synucléinopathie. Pour cela, nous avons effectué un marquage anti- α -syn dirigé spécifiquement contre l' α -syn humaine (**Figure 46**). Les animaux du groupe contrôle ou du groupe OTS ne présentent aucun marquage, confirmant la spécificité de notre protocole (**Figure 46**). Les animaux injectés avec le vecteur viral exprimant l' α -syn humaine mutée A53T (groupe Syn) montrent un marquage fort au niveau de la substance noire et du striatum, caractéristique du modèle et démontrant de l'expression de la protéine α -syn humaine mutée (**Figure 46**). Après expression virale de l'opéron tréhalose (groupe Syn + OTS), la quantité d' α -syn humaine est diminuée

significativement et très fortement dans la substance noire (**Figure 46A-B**). Aucune diminution de l' α -syn humaine n'est détecté pour ce même groupe au niveau du striatum (**Figure 46C-D**). Ces résultats suggèrent qu'une induction de la production de tréhalose diminue de manière drastique les niveaux d' α -syn humaine dans les neurones dopaminergiques de ce modèle rat de la maladie de Parkinson.

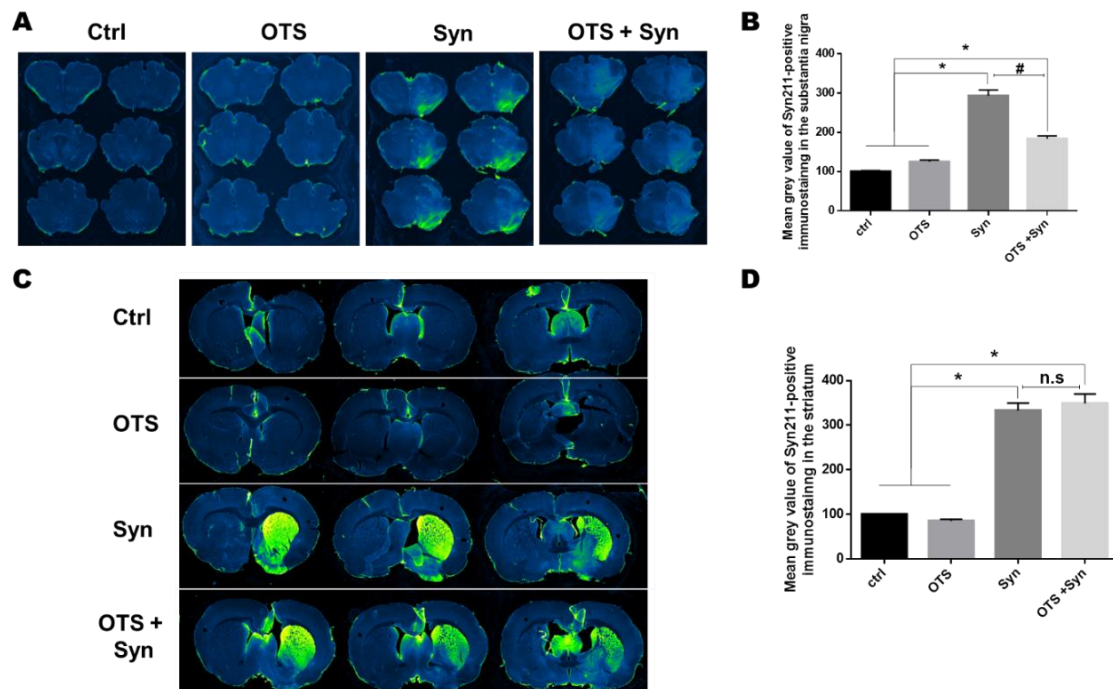


Figure 46 : Evaluation de l'effet de la production du tréhalose sur la synucléinopathie dans la substance noire et le striatum du modèle rat A53T-hSyn (A) Images illustratives et (B) quantification de l'immunomarquage anti- α -synucléine humaine dans la substance noire ipsilatérale (droit) des rats inoculés. (C) Images illustratives et (D) quantification de l'immunomarquage anti- α -synucléine humaine dans le striatum ipsilatéral (droit) des rats inoculés. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA. * $p < 0,05$. n.s : non-significatif. *Ctrl* : animaux ayant reçu le vecteur viral vide ssAAV2/9-CMVie/hSynP-WPRE-pA (N = 4) ; *OTS* : animaux ayant reçu le vecteur viral exprimant l'opéron tréhalose ssAAV2/9-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA (N = 5) ; *Syn* : animaux ayant reçu le vecteur viral exprimant l' α -synucléine humaine mutée A53T ssAAV2/9-CMVie/hSynP-A53ThSyn-WPRE-pA (N=6) ; *OTS+Syn* : animaux ayant reçu les vecteurs viraux exprimant l' α -synucléine humaine mutée A53T ssAAV2/9-CMVie/hSynP-A53ThSyn-WPRE-pA et l'opéron tréhalose ssAAV2/9-CMVie/hSynP-otsB-otsA-WPRE-pA (N=8).

5. Discussion :

Nous avons pu confirmer *in vitro* que l'expression des deux enzymes de catalyse du tréhalose par opéron dans notre vecteur viral induisait efficacement la production du sucre et permettait l'induction de l'autophagie. Nous avons montré que l'expression de ces deux enzymes *in vivo*

permettait de diminuer les niveaux d' α -syn mutée humaine dans la substance noire du modèle rat A53T-hSyn de la maladie de Parkinson. Cette diminution pourrait être expliquée par une induction de l'autophagie via la production de tréhalose qui augmenterait alors la dégradation de la protéine exogène. Cette hypothèse est en cours de validation avec l'analyse de différents marqueurs autophagiques dans les neurones dopaminergiques des animaux injectés. Cependant, cette diminution d' α -syn humaine pathologique n'a pas permis d'obtenir une neuroprotection significative des neurones dopaminergiques de la substance noire à ce temps post-injection, mais seulement une tendance. Enfin, aucun effet de l'expression de l'opéron tréhalose sur la synucléinopathie ou la quantité de fibres dopaminergiques n'a été observé dans le striatum. Cette absence d'effet au niveau du striatum pourrait s'expliquer par la faible neuroprotection au niveau des corps cellulaires malgré l'effet nigral observée sur la synucléinopathie.

La dernière étape de ce projet requiert une validation *in vivo* de l'expression des deux enzymes de catalyse du tréhalose, ainsi que de la production du tréhalose. Cette analyse n'a pu être effectuée à ce jour de par l'absence d'anticorps disponibles ciblant ces deux protéines et l'obtention de tissus frais. Pour répondre à cette problématique, de nouveaux vecteurs viraux, dans lesquels chacune des protéines sera taguée, sont en cours de production et de validation au sein du laboratoire. L'utilisation de ces nouveaux vecteurs viraux tagués permettra de connaître les niveaux d'expression et de production des deux enzymes de catalyse du tréhalose, mais également de leur stabilité au cours du temps. Cela permettra également de préparer une partie des tissus post-mortem avec un protocole de congélation sans fixation, afin de pouvoir mesurer le taux de tréhalose produit par l'expression de l'opéron tréhalose dans la substance noire des animaux.

6. Conclusion :

En conclusion, à ce stade de ce projet, nous avons pu obtenir une preuve de concept de la faisabilité de cette approche. L'expression dans un vecteur viral des deux gènes codant pour l'opéron tréhalose induit bien une clairance d' α -syn humaine, tout en gardant à l'esprit que le mécanisme sous-jacent doit être déterminé ainsi que la production du tréhalose. Une étape d'optimisation et de compréhension est nécessaire pour atteindre un effet neuroprotecteur via la production du tréhalose. Les analyses manquantes permettront de déterminer si l'expression des deux enzymes de l'opéron tréhalose est suffisante pour induire une activité autophagique efficace. Enfin, tester cette stratégie sur un modèle de synucléinopathie autre qu'un modèle d'expression virale de l' α -syn permettra de définir la validité de cette approche dans des conditions plus proche de la pathophysiologie. Ce projet est donc encourageant mais nécessite de nombreuses investigations et confirmations ultérieures.

PARTIE 3 : Comprendre la mécanistique cellulaire pour mieux combattre les effets pléiotropes dans les synucléinopathies

1. Contexte de l'étude :

Comme évoqué précédemment, les mécanismes cellulaires impliqués dans la neurodégénérescence et la synucléinopathie sont multiples dans ces pathologies. Nous avons déjà démontré l'implication des lysosomes et d'un stress lysosomal dans la pathologie.

Cependant, de nombreux autres organites s'avèrent altérés fonctionnellement au niveau intracellulaire dans les synucléinopathies et participent au stress cellulaire généralisé à l'origine de la mort neuronale. Parmi ces organites, le réticulum endoplasmique est indispensable au maintien de qualité de la production des protéines au niveau intracellulaire. L'accumulation d' α -syn mal-conformée et agrégée dans le réticulum endoplasmique entraîne l'activation du stress du réticulum endoplasmique via la voie de signalisation UPR (Unfolded Protein Response) (**Colla *et al.*, The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2012**). Cette cascade de stress du réticulum endoplasmique entraîne l'activation de caspases apoptotiques et de phénomènes inflammatoires contribuant à la mort cellulaire (**Colla *et al.*, The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2012, Sprenkle *et al.*, Molecular Neurodegeneration, 2017**). Des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique ont également été observés à des temps précoces dans les cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson (**Hoozemans *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007**) ou d'atrophie multisystématisée (**Makioka *et al.*, Journal of the Neurological Sciences, 2010**). L'implication du stress lysosomal et du stress du réticulum endoplasmique est donc avérée dans le processus pathologique de neurodégénérescence au sein des synucléinopathies (**Yin *et al.*, Ageing research reviews, 2017**). Cependant, leur degré d'implication réel, les mécanismes d'action exacts et le décours temporel reliant le stress lysosomal et du réticulum endoplasmique à la synucléinopathie restent à être caractérisés.

La compartimentation cellulaire requiert la présence d'une communication inter-organite essentielle à la régulation fine de l'homéostasie cellulaire dans les conditions physiologiques. Cette communication inter-organite s'établit notamment par la présence de points de contact membranaires entre deux organelles et permettant une inter-régulation métabolique et fonctionnelle au sein de la cellule. Le réticulum endoplasmique est impliqué dans des sites de contact membranaires avec différents organelles cellulaires tels que la mitochondrie, le Golgi, le peroxysome et la membrane cellulaire contribuant à leur régulation cellulaire (**Prinz, The Journal of cell biology, 2014**). La présence de site de contact membranaire entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique cellulaire permet de réguler l'homéostasie calcique

intracellulaire, essentielle à de nombreuses fonctions cellulaires. Lorsque le taux de calcium dans le réticulum est bas, les points de contact membranaires à la membrane plasmique sont mis en jeu afin de permettre une entrée du calcium au niveau intracellulaire (**Liou *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, Stathopoulos *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2006**).

Il a été également montré que la présence de sites de contact membranaires entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie permettait la régulation de différentes fonctions cellulaires parmi lesquelles : (i) la fission mitochondriale et donc la multiplication mitochondriale lorsqu'un apport énergétique est requis (**Friedman *et al.*, Science (New York, NY), 2011, Murley *et al.*, eLife, 2013**), (ii) la formation des autophagosomes (**Hamasaki *et al.*, Nature, 2013**) ou (iii) l'induction d'une cascade apoptotique (**Iwasawa *et al.*, The EMBO journal, 2011, Namba *et al.*, Cell reports, 2013**). L' α -syn a été montrée localisée au niveau des sites de contact entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, entraînant une altération de la régulation s'exerçant entre ces deux organites intracellulaires dans les conditions pathologiques (**Guardia-Laguarta *et al.*, The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2014**). Ces études sont très récentes et l'élucidation des mécanismes d'action et du rôle précis de ces points de contacts et des régulations inter-organelles sous-jacentes dans des conditions physiologiques demande de nombreuses investigations futures.

Nous nous sommes ici intéressés à déterminer la présence de sites de contact membranaires et donc d'une inter-régulation entre le lysosome et le réticulum endoplasmique en conditions physiologiques. L'hypothèse serait qu'une altération de cette communication pourrait se produire ou former un cercle vicieux suite à la présence simultanée d'un stress lysosomal et du réticulum, observée dans les synucléinopathies. Disséquer les mécanismes de l'inter-communication potentiellement existante entre ces deux organites permettrait de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'intervenir et de moduler ces phénomènes à l'origine du stress cellulaire et donc de la neurodégénérescence.

Ce projet est à l'état préliminaire et nécessite de nombreuses investigations futures, je ne vous présente ici que les premiers résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse, en parallèle de tous les autres projets déjà présentés.

2. Objectif de l'étude :

L'idée est d'évaluer la présence ou non d'une communication entre le lysosome et le réticulum endoplasmique, directement par des sites de contact membranaires ou indirectement, dans des conditions physiologiques afin de comprendre la régulation métabolique et fonctionnelle fine existante entre ces deux organelles. Ensuite, nous chercherons à déterminer comment cette intercommunication est altérée dans les conditions pathologiques des synucléinopathies expliquant la présence du stress lysosomal et du réticulum dans ces maladies.

3. Résultats préliminaires :

Pour mener à bien le premier objectif de cette étude, la stratégie adoptée a été d'induire un stress du lysosome ou du réticulum par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant différentes fonctions de ces organelles. L'induction du stress sur l'un des deux organites permettra de mesurer son impact sur l'autre organite en termes de nombre, localisation cellulaire et fonction.

La première étape a été d'établir une dose sub-toxique de chaque inhibiteur afin d'induire le stress d'un des organites *in vitro*. Pour cela, les cellules de neuroblastome humain M17 sont ensemencées dans des plaques 96 puits, traitées pendant 24h avec des concentrations croissantes de différents inhibiteurs pharmacologiques, puis soumises à un test de viabilité cellulaire au MTT (**Figure 47**).

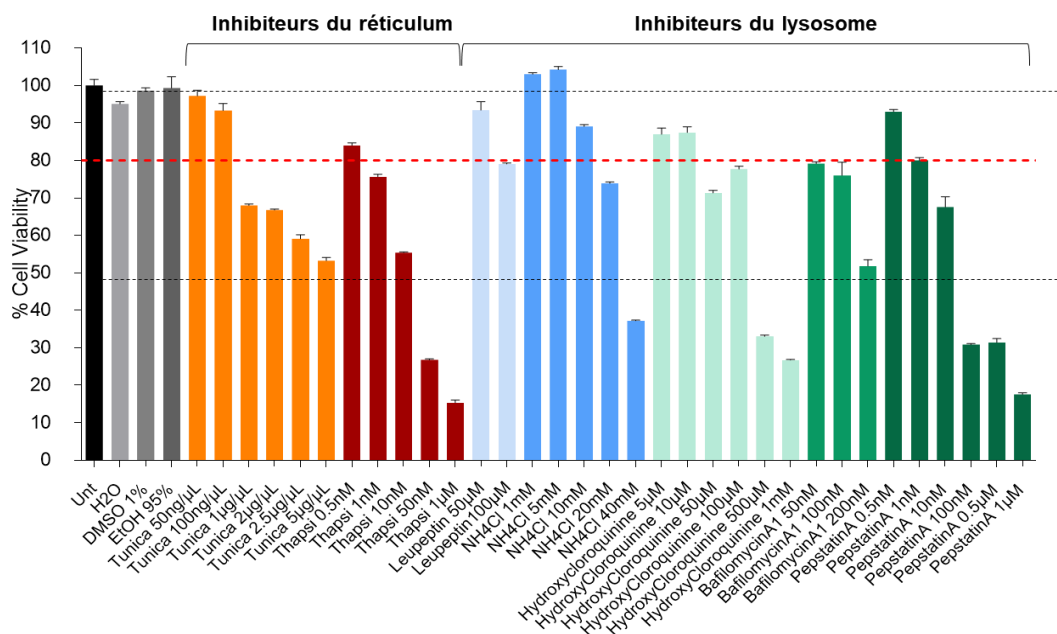


Figure 47 : Mesure de la viabilité cellulaire après traitement à des concentrations croissantes d'inhibiteurs du réticulum endoplasmique ou du lysosome. Inhibiteurs du réticulum endoplasmique : Tunicamycine (Tunica), Thapsigargine (Thapsi). Inhibiteurs du lysosome : Leupeptine, Chlorure d'ammonium (NH₄Cl), Hydroxycloquinine, BafilomycineA1

et PepstatineA. Le seuil de la dose sub-toxique est déterminé à 80% de viabilité cellulaire par rapport aux cellules non traitées.

A partir de ces résultats de viabilité cellulaire, nous avons pu déterminer la dose sub-toxique utilisable pour chacun des inhibiteurs afin de traiter les cellules dans des expériences ultérieures (Table 6).

Organite ciblé	Inhibiteurs	Concentration sub-toxique
Réticulum endoplasmique	Tunicamycin	100ng/ μ L
	Thapsigargin	0,5nM
Lysosome	Leupeptin	100 μ M
	NH ₄ Cl	10mM
	Hydroxychloroquine	10 μ M
	BafilomycinA1	50nM
	PepstatinA	1nM

Table 6 : Concentrations sub-toxiques retenues pour chaque inhibiteur du réticulum endoplasmique ou du lysosome pour les expériences futures.

En parallèle, afin de déterminer si des sites de contacts membranaires sont présents entre le réticulum et le lysosome en conditions physiologiques, un protocole de microscopie électronique a été appliqué sur les cellules M17 en utilisant une fixation avec 2,5% de glutaraldéhyde. Les premiers résultats obtenus montrent une proximité entre la membrane du lysosome et celle du réticulum (Figure 48).

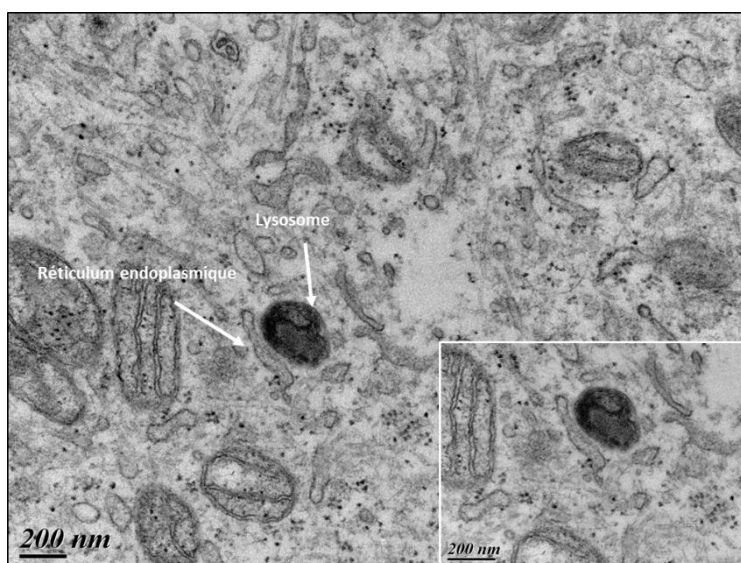


Figure 48 : Image de microscopie électronique illustrant la proximité entre la membrane du réticulum et celle du lysosome au niveau intracellulaire.

Cependant, cette approche n'étant pas adéquate pour une analyse quantitative des potentiels points de contact entre ces deux organites, un protocole de co-marquage d'immunofluorescence à haute résolution sera envisagé pour la suite. Nous avons donc mis au point le protocole de co-immunomarquage en utilisant la calréticuline comme marqueur du réticulum endoplasmique et le récepteur lysosomal LAMP2. La mise au point du protocole nous a déjà permis de visualiser la présence de point de colocalisation de ces deux marqueurs, suggérant une proche localisation des deux organites au niveau intracellulaire (**Figure 49**). De futures analyses restent cependant à être effectuées pour quantifier la possible colocalisation, à plus haute résolution en microscopie confocale.

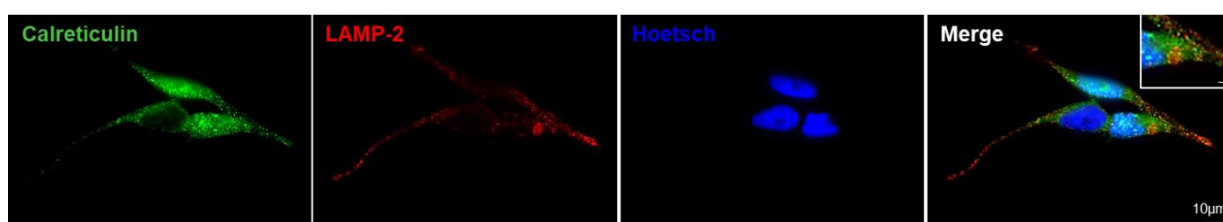


Figure 49 : Images illustratives de microscopie à fluorescence illustrant la proximité entre la membrane du réticulum et celle du lysosome au niveau intracellulaire. Un co-marquage anti-calréticuline (vert), anti-LAMP-2 (rouge) et un marquage des noyaux à l'aide du Hoetsch ont été effectués sur des cellules M17 non-traitées.

4. Futures directions de l'étude :

Cette étude n'est qu'à son commencement et de multiples expériences et analyses restent à être effectuées pour répondre aux différentes problématiques posées. Tout d'abord, la présence des points de contact membranaires à l'état physiologique n'est pas encore démontrée et nécessite des expériences d'imagerie à haute résolution.

Par la suite, l'induction du stress du réticulum endoplasmique ou du lysosome doit être confirmé par des analyses d'expression génique et de protéomique après traitement avec les inhibiteurs aux doses sub-toxiques choisies. Après avoir confirmé cette induction du stress, nous pourrions déterminer l'impact du stress d'un des deux organites sur l'autre en termes de points de contact membranaires, morphologie, nombre, localisation cellulaire et altération fonctionnelle de chacun des deux organites. Concernant l'aspect fonctionnel, nous nous concentrerons sur la mesure du trafic du cholestérol, du métabolisme calcique et de la synthèse lipidique pour le réticulum endoplasmique, et du transport du cholestérol et de la fonction de dégradation pour le lysosome.

Enfin, après avoir obtenu ces données à l'état physiologique, nous nous concentrerons sur des modèles de cellule de synucléinopathie afin d'y caractériser la communication physique et

fonctionnelle entre le réticulum endoplasmique et le lysosome, ainsi que sur une banque de tissus de modèles animaux de la MP disponibles au laboratoire et présentés dans cette thèse.

Enfin, l'identification des acteurs altérés dans ce processus de communication inter-organite permettra l'identification de potentielles nouvelles cibles en termes de thérapie future.

Discussion

L'ensemble de mon travail de thèse s'inscrit dans une démarche de recherche translationnelle menée au sein de l'équipe « Physiopathologie des syndromes parkinsoniens ». L'objectif de ces travaux a été de mener des analyses exploratoires mécanistiques et thérapeutiques afin de transposer les données expérimentales obtenues chez les rongeurs vers le primate non-humain à des finalités d'études cliniques de thérapie chez l'Homme. Dans cette discussion, je développerai des aspects liés aux différents projets présentés relatant des problématiques encore non résolues dans le domaine des synucléinopathies avant de conclure sur l'ensemble de mon travail de thèse. L'objectif de ce travail de thèse était multiple : étendre la compréhension des aspects mécanistiques de la neurodégénérescence des synucléinopathies afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans un premier temps, j'ai donc participé à une étude exploratoire mécanistique des facteurs biologiques impliqués dans le phénomène de neurodégénérescence dans un modèle primate non-humain de la maladie de Parkinson, nous permettant la validation de variables biologiques déjà reconnues comme acteurs de la neurodégénérescence mais également la mise en lumière de nouveaux acteurs tels que l'homéostasie du zinc entre autres. Cette étude nous a également permis de mettre en évidence une route de propagation de l' α -syn entre le système nerveux central et entérique, étayant une nouvelle fois l'hypothèse dite « prion-like » des synucléinopathies. Dans une seconde partie, nous nous sommes concentrés sur une approche thérapeutique ciblant la dégradation de l' α -syn par activation de la voie autophagique qui s'est avérée pertinente comme thérapie commune à toutes les synucléinopathies. Enfin, nous nous sommes intéressés aux voies de communication inter-organite dans un projet initié récemment, dans le but de déterminer l'existence d'une possible altération entre le réticulum endoplasmique et le lysosome dans les synucléinopathies et d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques. J'ai choisi d'intégrer dans ce manuscrit de thèse l'ensemble des travaux menés pendant ces trois années, y compris les plus préliminaires ou encore en cours de développement, afin d'illustrer cette approche translationnelle menée en parallèle et d'en discuter les points critiques dans cette dernière partie.

La modélisation expérimentale des synucléinopathies

L'approche translationnelle sous-jacente à tous les projets développés dans ce manuscrit de thèse implique l'utilisation de différents modèles partant de modèles cellulaires, aux rongeurs jusqu'à la validation dans des modèles mammifères supérieurs pré-cliniques tels que le primate non-humain.

L'utilisation de modèles rongeurs dans le domaine des synucléinopathies est essentielle à une première compréhension et caractérisation des mécanismes impliqués dans la

neurodégénérescence et la synucléinopathie. La faible hétérogénéité inter-individuelle, la reproductibilité rapide des résultats ou la durée de vie courte des rongeurs sont des avantages importants dans le domaine de la recherche. Cependant, la multitude de modèles de synucléinopathies utilisés aujourd'hui soulève le problème de la reproductibilité des données et de la validité pathophysiologique des résultats obtenus. En effet, aucun modèle de synucléinopathie n'est représentatif de l'ensemble des caractéristiques des synucléinopathies.

Le modèle rat A53T-hSyn de la maladie de Parkinson, utilisé afin d'évaluer l'effet neuroprotecteur d'une induction de la voie autophagique via une surexpression virale de TFEB (Projet n°6) ou via la production du sucre tréhalose (Projet n°7), répond au critère de neurodégénérescence avec 40-50% de perte dopaminergique dans la voie nigro-striée et présente des déficits moteurs facilement analysables sur l'espèce rat dès 4 mois post-injection. Cependant, la surexpression induite dans ce modèle ne peut être contrôlée en termes de degré d'expression et de surface de transduction, et induit une accumulation importante et rapide de la protéine α -syn pathologique, qui peut s'avérer hétérogène entre les cellules ciblées au sein de la région injectée. Ce type de modèle reste néanmoins intéressant pour une transposition à des espèces supérieures telles que les marmosets (**Eslamboli *et al.*, Brain, 2007**).

Le deuxième modèle présenté dans ce manuscrit s'appuie sur l'injection de formes synthétiques fibrillaires (PFF) d' α -syn dans la substance noire de souris sauvages (projet n°1). Par une injection de 2 μ L de PFF à 5 μ g/ μ L dans la substance noire des souris sauvages, nous n'avons pas pu reproduire les résultats du groupe de Virginia Lee qui ont injecté 5 μ g de ces mêmes PFF dans le striatum de souris sauvages. Le site d'injection semble, entre autres critères, déterminant pour la reproductibilité de ce modèle (**Zhang *et al.*, Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2019**). Bien qu'une neurodégénérescence de l'ordre de 30% est présente dans le modèle publié et associée à la synucléinopathie induite par l'injection des PFF ainsi que des symptômes moteurs (**Luk *et al.*, Science, 2012**), la quantité d' α -syn pathologique utilisée (5 μ g) pour induire cette neurodégénérescence est importante et n'est pas représentative de la pathophysiologie des synucléinopathies (de l'ordre du ng) (**Iwai *et al.*, 1995**). Ce modèle reste néanmoins un modèle de référence actuel pour l'étude de la propagation de la synucléinopathie, également chez le primate non-humain (**Shimozawa *et al.*, Acta neuropathologica communications, 2017**).

Le troisième modèle présenté dans ce manuscrit repose sur l'injection de fractions purifiées de corps de Lewy à partir de cerveaux post-mortem de patients atteints de la maladie de Parkinson

(Recasens et al., Ann Neurol, 2014). Nous avons confirmé qu'une inoculation de fractions LB (contenant 90% d' α -syn agrégée) provenant de mésencéphale de patients parkinsoniens induit une neurodégénérescence et une synucléinopathie dans une large cohorte de primates non-humains, confirmant la transposabilité du modèle rongeur au modèle mammifère supérieur **(Perez-Villalba et al., The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2018, Recasens et al., Ann Neurol, 2014)**. L'utilisation d'un matériel pathologique humain à des doses se rapprochant de la pathophysiologie (ng d' α -syn) est donc un modèle reproductible entre les espèces. De manière surprenante, l'injection de fractions noLB (ne contenant que 10% d' α -syn agrégée) induit également une neurodégénérescence et une synucléinopathie associée chez le primate non-humain, contrairement à son inoculation chez la souris. Ce dernier résultat indique qu'une caractérisation approfondie et une purification différentielle des espèces d' α -syn en présence dans chacune des fractions est nécessaire pour tenter d'identifier l'(les)espèce(s) toxique(s) présente(s) dans chacune de ces fractions, mais aussi pour comprendre l'induction des différentes signatures pathologiques associées à chaque inoculum.

Ce dernier résultat souligne également la nécessité de transposer les données obtenues chez les modèles rongeurs vers des modèles supérieurs tels que le primate non-humain. Le primate non-humain s'avère le modèle de référence dans la recherche translationnelle en neurosciences. En effet, la taille de l'organe, le nombre de cellules, la physiologie, le répertoire comportemental, l'anatomie et les connexions du système nerveux central des primates non-humains sont les plus proches de l'Homme **(Herculano-Houzel, 2009)**. Par exemple, les rongeurs ne semblent pas posséder de cortex préfrontal développé, qui joue un rôle dans les fonctions cognitives et organisationnelles **(Mars & Verhagen, Frontiers in Human Neuroscience, 2013)**. De plus, les primates non humains sont les espèces les plus proches génétiquement de l'Homme **(Kumar & Hedges, Nature, 1998)**. Le processus de vieillissement des cellules du système nerveux central des primates non humains se rapprochent également de l'Homme **(Finch & Austad, Age (Dordrecht, Netherlands), 2012)**, point important dans l'étude des synucléinopathies dont l'âge est le premier facteur de risque. Enfin, les études sur des primates non-humains sont également représentatives de par l'hétérogénéité inter-individuelle observée pour chaque groupe, reflétant là-aussi les études cliniques humaines. Ainsi, le primate non-humain est le modèle de référence en neurosciences que ce soit pour comprendre des mécanismes pathologiques fondamentales, tester des cibles thérapeutiques en préclinique (pharmacocinétique et toxicité) ou bien identifier des biomarqueurs pertinents **(Aron Badin et al., European Journal of Pharmacology, 2015, Harding, ILAR Journal, 2017)**. Nous pouvons ainsi imaginer, afin de confirmer nos données sur

l'effet neuroprotecteur induit par la surexpression de TFEB dans les synucléinopathies, une prochaine étude qui se concentrerait sur une induction virale, ou via des composés pharmacologiques ou naturels, de TFEB dans un modèle de Parkinson et d'AMS de primate non-humain (projet n°6). Les modèles de primates non-humains d'AMS disponibles à l'heure actuelle sont des modèles d'expression virale d' α -syn humaine spécifiquement dans les oligodendrocytes du striatum, amenant à un phénotype de type parkinsonien (**Bassil *et al.*, 2017, Mandel *et al.*, *Acta neuropathologica communications*, 2017**). Les nouvelles technologies de biologie moléculaire telles que l'utilisation du système CRISPR-Cas9 pourrait permettre la production de modèle transgénique de primate non-humain et permettre l'induction de modèle d'AMS plus complet et à des stades tardifs de la pathologie, regroupant les phénotypes parkinsonien et cérébelleux ainsi que l'atteinte des noyaux autonomes (**Jennings *et al.*, *Nature Neuroscience*, 2016**).

L'hypothèse « prion-like » de l' α -synucléine

Comme décrit dans l'introduction, l' α -syn adopte un comportement aux caractéristiques communes avec la protéine prion telles que : (i) une agrégation pathogénique sous forme de fibres amyloïdes, (ii) une propagation de cellule-à-cellule et inter-régionale et (iii) une induction de la pathogénicité à une protéine α -synucléine naïve dans une cellule nouvellement infectée. Seule l'absence de preuve expérimentale ou clinique d'une propriété infectieuse inter-individuelle ou inter-espèce indique que l' α -syn est une protéine « prion-like » et non une protéine prion à proprement parler.

Nous avons démontré (projet n°2) qu'une inoculation avec des fractions de corps de Lewy contenant de l' α -synucléine agrégée (fraction LB) ou peu agrégée (fraction noLB) entraînait une neurodégénérescence dans les deux cas. Cette neurodégénérescence était associée à l'accumulation d' α -synucléine pathogène et phosphorylée dans les deux groupes d'expérience. Cette étude a donc permis de corroborer l'hypothèse « prion-like » à grande échelle sur une cohorte large de primates non-humains. Cependant, de nombreuses questions demeurent pour caractériser entièrement les propriétés « prion-like » de la protéine.

La première question concerne le point d'initiation de la pathologie et donc du phénomène de propagation « prion-like » de la synucléinopathie à l'origine de l'extension de la pathologie. Nous avons pu mettre en évidence une route bidirectionnelle de propagation de la protéine α -syn dans notre modèle de primate non-humain de la maladie de Parkinson : entre le système nerveux

entérique et le système nerveux central (projet n°4). Dans ce projet, nous avons démontré pour la première fois qu'une injection d' α -syn dans le système nerveux entérique induisait une perte dopaminergique au niveau de la voie nigro-striée après la propagation de la synucléinopathie dans le système nerveux central. De manière encore plus intéressante, nous avons également mis en lumière une nouvelle route de propagation rostro-caudale avec l'apparition de la synucléinopathie dans le système nerveux entérique après injection de matériel pathologique humain dans le système nerveux central. La voie vagale ne semble pas être impliquée dans la propagation entre ces deux systèmes dans notre modèle de synucléinopathie et les données suggèrent des routes de propagation alternatives telles que les fluides biologiques. Cette étude questionne aussi l'intérêt d'une recherche de biomarqueurs entériques (coloscopie,...) dans le but d'établir un diagnostic plus précoce de la pathologie, étant donné que l'initiation de la pathologie peut être centrale ou entérique et que les individus sains présentent également des dépôts d' α -syn dans le système nerveux entérique sans développement de la pathologie par la suite (**Yan et al., Medicine, 2018**). Des études de cohortes à grande échelle seront déterminantes pour justifier de l'intérêt d'utiliser le niveau de l' α -syn entérique comme marqueur précoce de la pathologie.

Ce résultat laisse néanmoins suggérer que la pathologie pourrait s'initier au niveau du système gastro-intestinal avant une propagation rostrale vers le système nerveux central. Cette hypothèse est étayée par la présence de symptômes gastriques, tels que la constipation, dans des phases précoces de la pathologie chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, ainsi que par la présence de corps de Lewy dans les tissus gastriques des patients. Braak et collaborateurs avaient déjà suggéré une origine entérique de la pathologie dans leur étude de propagation de la synucléinopathie à partir de cerveaux post-mortem de patients atteints de la maladie de Parkinson (**Braak et al., Neurobiol Aging, 2003**). Récemment, des études tentent d'expliquer les mécanismes d'initiation entérique de la pathologie. Au niveau du système nerveux entérique, l' α -syn présente jouerait un rôle dans la défense immunitaire contre les pathogènes (**Stolzenberg et al., Journal of Innate Immunity, 2017**). Elle permettrait la migration et l'activation de cellules immunitaires telles que les neutrophiles ou les monocytes lors d'une infection virale intestinale (**Stolzenberg et al., Journal of Innate Immunity, 2017**). Le microbiote intestinal des patients atteints de la maladie de Parkinson présente une signature différente de celui des sujets sains avec une diminution de la quantité du groupe des *Clostridium coccoides* et une augmentation de la quantité de *Lactobacillus* (**Hasegawa et al., PLOS ONE, 2015**). Une transplantation fécale du microbiote provenant de patients parkinsoniens par voie orale à des souris transgéniques exprimant l' α -syn augmente les dysfonctions motrices et la synucléinopathie observés dans ce modèle

(Sampson *et al.*, Cell, 2016). De plus, exposer l' α -syn à la bactérie intestinale *Escherichia Coli*, produisant la protéine amyloïde dite curli, induit l'agrégation de la protéine α -syn, notamment dans le système nerveux central via des processus immunitaires et inflammatoires (Chen *et al.*, Scientific reports, 2016). Ces résultats suggèrent qu'une modification du microbiote intestinal jouerait un rôle dans l'initiation entérique de la pathologie chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Nous aurions pu envisager d'observer la présence de symptômes gastro-intestinaux sur les primates non-humains de notre étude au cours de leurs deux années de vie. Cependant, cela reste compliqué à mettre en place au niveau logistique sur un élevage en colonie et aurait nécessité la mise en place d'un élevage individuel et un suivi longitudinal des fèces des animaux. Nous aurions également pu prélever et analyser le microbiote intestinal ou prélever une quantité plus importante de tissus gastrique chez les animaux injectés au niveau de la paroi ventrale de l'estomac afin d'y étudier l'inflammation. La route de propagation rostrale suggérée aujourd'hui entre le système nerveux entérique et le système nerveux central est la voie vagale (Ulusoy *et al.*, EMBO Mol Med, 2013). Cependant, dans notre modèle primate non-humain de la maladie de Parkinson, la voie vagale n'est pas impliquée et les fluides biologiques semblent être de potentielles voies de propagation alternatives de la protéine (Santos *et al.*, Frontiers in Neurology, 2019). Pour confirmer ce résultat, une vagotomie préalable à l'inoculation des fractions de corps de Lewy pourrait être envisagée dans de futures études.

La route bidirectionnelle de propagation mise en évidence dans notre projet suggère également une propagation caudale de la protéine du système nerveux central vers le système nerveux périphérique. Cette idée sous-entend que le site d'initiation de la pathologie pourrait être localisé dans des régions plus rostrales au sein du système nerveux central. Une seconde hypothèse suggère ainsi que le point d'initiation de la pathologie est localisé au niveau du bulbe olfactif. Les dysfonctions olfactives telles qu'une anosmie sont présentes dans les phases précoces de la pathologie chez les patients, des années avant que le diagnostic de la maladie de Parkinson soit posé (Fullard *et al.*, Neuroscience bulletin, 2017). L'équipe de Braak a également démontré la présence d'inclusions positives pour l' α -syn dans le bulbe olfactif, dès le premier stade de l'expansion de la synucléinopathie (Braak & Del Tredici, Journal of Parkinson's disease, 2017). Récemment, l'injection de fibres synthétiques d' α -syn dans le bulbe olfactif de souris sauvages induit la propagation de la synucléinopathie à des zones caudales dans le système nerveux central, confirmant que le bulbe olfactif peut s'avérer être un point d'initiation de la pathologie (Rey *et al.*, The Journal of experimental medicine, 2016). Cette propagation s'exercerait via les projections du bulbe olfactif au sein des différentes zones du système nerveux

central (**Ubeda-Bañon et al., Brain Structure and Function, 2014**). Une inoculation des fractions de corps de Lewy dans le bulbe olfactif de primates non-humains permettrait de corroborer ces études en utilisant un matériel pathologique humain.

Une dernière hypothèse regroupe l'ensemble de ces études et suggère que les points d'initiation de la synucléinopathie sont multiples. La pathologie de l' α -syn débiterait alors au niveau de différents sites (bulbe olfactif et système nerveux entérique) avant de se propager à travers les nombreuses aires cérébrales dans un schéma multi-centrique (**Klingelhofer & Reichmann, Journal of Neural Transmission, 2017**).

Outre la localisation du point d'initiation de la pathologie toujours débattue, le mode de propagation de la protéine α -syn reste inconnu. Un mode de propagation direct de cellule à cellule peut être envisagé, tout comme un mode de propagation indirect via des transferts de messagers extracellulaires. L'étude des voies d'entrée et de sortie de la protéine au niveau cellulaire est donc primordiale afin de pouvoir inhiber ces mécanismes *in vivo* et apporter une première réponse à cette problématique.

De plus, le mécanisme d'induction de la pathogénicité de l' α -syn pathologique à la protéine naïve d'une cellule nouvellement infectée reste inconnu puisqu'aucune interaction physique ou caractérisation fonctionnelle n'a pu être à ce jour mise en évidence. Pour y apporter une première réponse, des études *in vitro* doivent d'abord être envisagées afin de déterminer la présence ou non d'hétéro-complexe protéique pathologique/naïve au niveau structural.

Enfin, des études expérimentales de transmissibilité ou de franchissement inter-espèces doivent être menées pour confirmer l'absence de propriété infectieuse de la protéine α -synucléine.

De nombreuses études restent donc à être menées et s'avèrent déterminantes dans la compréhension de l'hypothèse « prion-like » des synucléinopathies.

L'hypothèse de « souches » existantes d' α -syn

L' α -syn reste le dénominateur commun à toutes les synucléinopathies. L'injection de fractions provenant du cortex cingulaire de patients parkinsoniens n'induit pas ou peu de synucléinopathie ni de neurodégénérescence (Projet n°1), contrairement aux fractions provenant du mésencéphale de patients parkinsoniens (Projet n°2 & 4). Ceci pourrait s'expliquer par une différence de contenu dans ces corps agrégatifs, et par voie de conséquence une toxicité différentielle (**Sakamoto et al.,**

Experimental Neurology, 2002). Cette différence pathologique peut s'expliquer par une différence structurelle de conformation, de pathogénicité (phosphorylation), de maturation de l'agrégat ou bien de composition de protéines co-facteurs entre neurones dopaminergiques et neurones corticaux. Des études suggèrent une différence structurale avec une conformation plus compacte et plus ordonnée de l' α -syn dans les corps de Lewy provenant du mésencéphale comparé aux corps de Lewy corticaux (**Katsuse *et al.*, Journal of the Neurological Sciences, 2003, Kosaka, Acta Neuropathologica, 1978**). Pour répondre plus précisément à cette problématique, des analyses structurelles biophysiques, de protéomique ou de lipidomique sont nécessaires afin de mieux caractériser les inclusions d' α -syn provenant de différentes régions cérébrales pour une même pathologie, ou même provenant de deux pathologies différentes (MP vs AMS) amenant l'idée de souche d' α -syn (**Uchihara *et al.*, 2005**). La localisation cellulaire de la protéine α -syn diffère entre la MP et l'AMS, suggérant que la nature des agrégats est également spécifique à chaque pathologie. La diversité phénotypique observée au sein des synucléinopathies semble liée à des différences conformationnelles de la protéine. Les inclusions gliales cytoplasmiques caractérisant l'AMS contiennent l' α -syn sous forme annulaire et plus compacte que les corps de Lewy de la MP (**Peng *et al.*, Nature, 2018, Pountney *et al.*, 2005**). L'injection de deux conformations différentes d' α -syn synthétiques dans la substance noire de rat corrobore ces données. En effet, l'injection de rubans synthétiques d' α -syn induit l'agrégation de l' α -syn endogène dans les neurones et les oligodendrocytes tandis que les fibres synthétiques d' α -syn n'induisent la synucléinopathie qu'au niveau neuronal, suggérant qu'une conformation spécifique de l' α -syn confère à la protéine la capacité d'induire la pathogénicité au niveau oligodendroglial (**Bousset *et al.*, Nature communications, 2013, Peelaerts *et al.*, Cell & Tissue Research, 2018, Peelaerts *et al.*, Nature, 2015**). De même, les fibres synthétiques formées en présence de lysat de culture primaire d'oligodendrocytes de rat induisent une pathologie plus importante *in vitro*, comparé à des fibres synthétiques formées en présence de lysat provenant de cultures primaires de neurones de rat (**Peng *et al.*, Nature, 2018**). L'analyse du groupe de primates non-humains ayant reçu une injection striatale de GCI provenant de patients atteints d'AMS (Projet n°2) permettra de confirmer une induction pathogénique, potentiellement avec une signature différentielle de celle obtenue pour le groupe LB. Ces résultats futurs permettront d'étayer l'idée de souche d' α -syn liée à chaque synucléinopathie.

La vulnérabilité cellulaire dans les synucléinopathies

Comme démontré dans ce manuscrit (Projets n°6), augmenter la clairance de l' α -syn via l'activation de la voie autophagique induit des effets neuroprotecteurs dans un modèle rongeur de la MP et de l'AMS, confirmant également le rôle toxique de l'accumulation de l' α -syn dans les processus de neurodégénérescence. Cependant, dans environ 30% des cas cliniques de la MP caractérisés par une perte de 50% de neurones dopaminergiques nigraux, l'étude anatomopathologique ne montre aucune présence de corps de Lewy dans la substance noire (**Lewy, Pathologische anatomie Handbuch der neurologie, 1912, Tretiakoff, Theses de Paris, 1919**), suggérant que l' α -syn pathogénique n'explique pas à elle seule le phénomène de neurodégénérescence. Ainsi, des facteurs autonomes, non associés à la présence d' α -syn, semblent également jouer un rôle dans la neurodégénérescence. De manière frappante, seule la moitié des patients diagnostiqués cliniquement comme atteints de la maladie de Parkinson présentent dans leur cerveau une distribution de corps de Lewy en corrélation avec les stades de Braak décrits pour cette pathologie (**Halliday et al., Expert Review of Neurotherapeutics, 2012, Kalaitzakis et al., Neuropathol Appl Neurobiol, 2008**). Or, la perte neuronale dans les synucléinopathies est localisée à certaines régions du système nerveux central. Dans la MP, la substance noire pars compacta est la plus affectée (~68%) mais d'autres régions localisées dégèrent parmi lesquelles: le noyau pédonculopontin (41%), le locus coeruleus (31-94%), le noyau moteur dorsal du nerf vague (55%), l'aire tegmentale ventrale (31%), l'hypothalamus (50%) ou le bulbe olfactif (57%) (**Giguère et al., Frontiers in neurology, 2018**). Nous n'avons étudié seulement la dégénérescence dans le système nigro-striée dans le modèle primate non-humain inoculé avec les fractions LB et noLB (Projet n°2). Un comptage par stéréologie du nombre de neurones dans ces autres structures cérébrales décrites comme vulnérables à la dégénérescence pourrait amener une preuve supplémentaire d'une susceptibilité neuronale localisée, et une nouvelle analyse par machine-learning implémentant ces données en sortie pourrait s'avérer intéressante. De même, chez les patients atteints d'AMS, les régions les plus affectées sont concentrées au niveau de la voie nigro-striée, le système olivo-ponto-cérébelleux et les noyaux autonomes (**Jellinger, Acta Neuropathol, 2008**). Ainsi, la perte neuronale au sein du système nerveux central est restreinte à certaines aires cérébrales, malgré une diffusion plus large des inclusions positive pour l' α -syn. Ces observations suggèrent une vulnérabilité neuronale spécifique s'appuyant sur des processus autonomes, non-associés à la pathogénicité de la protéine α -syn. Plusieurs hypothèses sont à ce-jour étudiées pour une compréhension des facteurs autonomes impliqués sans cette vulnérabilité neuronale, et restent à être pris en considération dans les analyses futures des projets présentés dans ce manuscrit.

La première hypothèse repose sur l'observation des projections axonales des neurones affectés par une dégénérescence. Les neurones de la substance noire, du locus coeruleus, et du noyau pédonculopontin présentent tous des axones hautement ramifiés et peu myélinisés (**Giguère *et al.*, Frontiers in neurology, 2018**). Les neurones de la substance noire, par exemple, projetant dans le striatum, possèdent plusieurs centaines de milliers de sites synaptiques de libération de la dopamine (**Matsuda *et al.*, The Journal of Neuroscience, 2009**). Cette arborisation particulière implique un besoin énergétique important nécessaire à la libération des neurotransmetteurs. Le stress mitochondrial est donc très important dans les axones de ces neurones, et il a été montré que diminuer la taille de l'arborisation permettait de diminuer ce stress et donc la vulnérabilité neurodégénérative (**Pacelli *et al.*, Current Biology, 2015**). Associée à cette arborisation, les neurones de ces mêmes aires cérébrales présentent une activité lente tonique et autonome de pace-making. Ils déchargent donc des potentiels d'action en l'absence de signaux excitateurs d'entrée (**Surmeier *et al.*, Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2012**). Les potentiels d'action sont lents et rythmés et sont accompagnés d'une entrée intracellulaire de calcium Ca^{2+} par l'ouverture de canaux voltage-dépendants tels que le canal Cav1 (**Guzman *et al.*, The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2009**). Les neurones vulnérables à la neurodégénérescence tels que les neurones dopaminergiques de la substance noire présentent de faibles taux de protéines tampon du Ca^{2+} (**Foehring *et al.*, Journal of neurophysiology, 2009**), contrairement aux neurones moins vulnérables tels que ceux de l'aire tegmentale ventrale qui contiennent une quantité importante de la protéine Calbindin se liant au calcium (**Blesa & Vila, Movement Disorders, 2019, Inoue *et al.*, Movement Disorders, 2019, Philippart *et al.*, J Neurosci, 2016**). L'entrée de Ca^{2+} intracellulaire permet de maintenir l'activité tonique en jouant sur le potentiel membranaire mais également de promouvoir la respiration cellulaire mitochondriale via son entrée dans la mitochondrie, permettant de fournir l'apport bioénergétique suffisant. Cependant, l'altération des fonctions mitochondriales, autophagiques ou de protéostasie liée à l'âge pousse les neurones à leur point limite bioénergétique, facilitant la mort neuronale. Dans cette situation, l'entrée calcique entraîne également la production d'espèces réactives de l'oxygène au niveau de la mitochondrie qui induisent des dommages protéiques, lipidiques et de l'ADN, en plus de l'induction des voies de l'apoptose (**Surmeier *et al.*, Nature reviews Neuroscience, 2017**). De manière intéressante, les oligodendrocytes, qui sont les cellules les plus vulnérables à la dégénérescence dans l'AMS présentent également une demande énergétique anormalement importante (**Bradl & Lassmann, Acta neuropathologica, 2010**). Dans notre étude du Projet n° 2 sur le modèle primate non humain de la MP, le taux de calcium dans la substance noire s'avère être le dixième meilleur prédicteur de neurodégénérescence dans

le groupe LB, faisant écho à cette hypothèse de vulnérabilité neuronale, bien que nous n'ayons pu mettre en évidence une altération des concentrations calciques dans la substance noire des différents modèles de la MP (Projet n°3). Nous aurons pu imaginer des mesures d'activité électrique dans notre modèle de primate non-humain de la MP afin d'étudier l'activité tonique des neurones pace-makers au cours de l'induction de la pathologie (Projet n°2). Il serait également intéressant d'étudier, dans des analyses ultérieures, la quantité d'espèces réactives de l'oxygène produite et l'activation des voies apoptotiques (taux protéiques des caspases) dans différentes régions cérébrales de ces modèles de la MP mais également dans les modèles d'AMS afin d'étudier ces aspects de vulnérabilité neuronale.

Le deuxième processus autonome pouvant expliquer la vulnérabilité neuronale, notamment des neurones dopaminergiques nigraux, repose sur les conséquences du métabolisme de la dopamine telles que la production de la neuromélanine (**Vila, Movement Disorders, 2019**). L'oxydation de la dopamine entraîne la formation de quinones dont la neuromélanine. La plupart des neurones dopaminergiques nigraux sont mélanisés contrairement aux neurones de l'aire tegmentale ventrale, moins susceptibles à la neurodégénérescence. De manière intéressante, des données suggèrent que les neurones dopaminergiques mélanisés sont les premiers à dégénérer (**Hirsch, Ann Neurol, 1992**). Il serait donc intéressant d'effectuer un marquage histochimique de la neuromélanine et de compter par stéréologie le nombre de neurones dopaminergiques mélanisés dans la substance noire de notre modèle primate non-humain de la MP (Projet n°2) afin de corroborer ces données. Enfin, les rongeurs ne possèdent pas les outils cellulaires à la formation de ce pigment, soulevant là encore l'intérêt d'une transposition aux modèles supérieurs de primates non-humains pour l'étude de ces pathologies. Récemment, un nouveau modèle murin exprimant l'enzyme de synthèse de la neuromélanine à partir de la dopamine montre qu'une production de la neuromélanine dans les neurones dopaminergiques de la substance noire suffit à elle seule à induire une neurodégénérescence et la formation de corps d'inclusions de type LB (**Carballo-Carbajal et al., Nature communications, 2019**), palliant cette problématique. Pour nos études futures, il serait pertinent d'injecter les fractions LB et noLB à ce nouveau modèle murin afin de tenter d'établir la contribution respective de l' α -syn et de la vulnérabilité neuronale dans les synucléinopathies.

La neuromélanine est également un compartiment de stockage du fer (**Bohic et al., Analytical Chemistry, 2008**). Il a été montré une augmentation des taux de fer dans la substance noire des patients parkinsoniens, due à une baisse des taux de ferritine – protéine de chélation du fer – et une augmentation de la production de mélanine avec l'âge (**Sian-Hülsmann et al., Journal of**

Neurochemistry, 2011). Une altération des taux de fer jouerait également un rôle dans les processus autonomes de vulnérabilité cellulaire, notamment concernant les neurones dopaminergiques nigraux. Des taux élevés de fer entraîneraient la production d'espèces réactives de l'oxygène et impacteraient l'activité mitochondriale, promouvant la mort cellulaire (**Friedman et al., Handbook of Clinical Neurology, 2007**). De manière intéressante, les macaques ayant reçu une injection de fractions LB dans la substance noire présentent une augmentation du taux de fer dans la substance noire (Projet n°3). De même, une injection de fractions LB dans le striatum de macaque préalablement injecté avec du MPTP entraîne une augmentation du fer, contrairement aux mêmes singes sans injection préalable de MPTP (Projet n°3). Ces résultats suggèrent une contribution du fer dans les phénomènes de neurodégénérescence et potentiellement un lien avec la vulnérabilité neuronale. L'altération des taux de cuivre dans la substance noire de ce même modèle indique également que l'altération des différents métaux peuvent jouer un rôle dans la vulnérabilité neuronale (Projet n°3). Le zinc s'est également avéré altéré dans différentes études décrites dans ce manuscrit (Projet n°2 et 3). L'étude de l'effet du zinc sur le processus de neurodégénérescence, notamment, par diminution des taux de zinc libre via un traitement dans des modèles parkinsoniens avec, par exemple, l'utilisation du chélateur de zinc clioquinol, permettra de confirmer l'implication de ces métaux dans la vulnérabilité neuronale observée dans les synucléinopathies.

Ainsi, outre l'effet pathogénique de l' α -syn sur les cellules et les régions affectées par l'expansion de la synucléinopathie, divers facteurs autonomes entrent en jeu en parallèle dans la vulnérabilité neuronale, expliquant les processus neurodégénératifs sélectifs de certains types cellulaires ou aires cérébrales dans ces pathologies.

Pléiotropie et stratégie thérapeutique combinée

Comme mis en avant dans le projet n°2, de multiples acteurs cellulaires sont impliqués dans les mécanismes de neurodégénérescence associée à l' α -syn. Parmi les meilleurs prédictors pour les deux groupes de traitement, on retrouve des acteurs des systèmes de dégradation (autophagique et du protéasome), des variables liées aux taux de métaux (calcium et zinc), des variables de neurotransmission (le taux de GABA dans le globus pallidus interne) et des variables liées aux processus inflammatoires (marqueur de réaction microgliale Iba1) en plus des variables indiquant une synucléinopathie établie dans différentes zones cérébrales. Ce projet met ainsi en valeur les effets pléiotropes toxiques induits par l' α -syn et également décrits dans l'introduction de ce manuscrit comme acteurs de la neurodégénérescence.

En nous concentrant sur la clairance de l' α -syn dans un modèle rat de la MP et un modèle murin de l'AMS, nous avons démontré une efficacité thérapeutique avec une neuroprotection obtenue après activation de la voie macroautophagique via la surexpression du facteur de transcription TFEB (Projet n°6). Malgré un effet neuroprotecteur significatif et une diminution des quantités d' α -syn agrégée dans le modèle murin d'AMS surexprimant TFEB sous un promoteur oligodendroglial, l'effet reste moindre ($p=0,06$). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la voie macroautophagique n'est pas la seule voie de dégradation impliquée dans la clairance de l' α -syn. Comme évoqué précédemment, la voie autophagique médiée par les protéines chaperons et le système ubiquitine/protéasome sont aussi impliqués dans la dégradation de la protéine. Une combinaison thérapeutique permettrait ainsi d'augmenter la clairance de l' α -syn pathogénique de manière plus efficace. On peut ainsi imaginer une combinaison de surexpression virale de TFEB, pour la voie macroautophagique, et de Lamp2A (Xilouri *et al.*, **Brain**, 2013), pour la voie autophagique médiée par les protéines chaperons afin de diminuer la pathogénicité liée à l' α -syn de manière plus efficace comme thérapie commune à toutes les synucléinopathies. Une autre hypothèse expliquant la présence d'une neuroprotection malgré un effet moindre sur l' α -syn pathogénique serait que l'effet bénéfique obtenu sur les neurones serait exercé via une myélinisation efficace des axones dopaminergiques. L'activation de la voie autophagique rétablie dans les oligodendrocytes permettrait de maintenir la fonction physiologique des oligodendrocytes, déficitaire dans la pathologie, et ainsi de produire la quantité de myéline suffisante à la protection des axones neuronales (Bradl & Lassmann, **Acta neuropathologica**, 2010). Cet effet entrainerait alors la protection des corps cellulaires dopaminergiques contenus dans la substance noire. Afin de valider cette hypothèse, un marquage histochimique de la myéline sur les coupes de substance noire et du striatum permettrait d'y répondre.

La poursuite de l'analyse de la communication inter-organelle entre le lysosome et le réticulum endoplasmique permettra également de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans les phénomènes de neurodégénérescence au sein des synucléinopathies. Trouver des thérapies communes ciblant soit l' α -syn pathogénique ou soit des dénominateurs communs cellulaires impliqués dans la mort cellulaire dans toutes les synucléinopathies s'avèrent être une stratégie prometteuse pour tenter de soigner ces pathologies. Une combinaison de différentes stratégies thérapeutiques ciblant ces différents acteurs s'avère pertinente en tenant compte des variables biologiques diverses et complexes impliquées dans les synucléinopathies (Valera & Masliah, **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, 2016).

Conclusion

Ce travail de thèse met en exergue le rôle central de la protéine α -syn dans l'étiologie des synucléinopathies. Dans une première partie, nous avons notamment corroboré mais également mis en lumière des mécanismes cellulaires induits par l' α -syn et impliqués dans les mécanismes de neurodégénérescence. Par la suite, ce travail a mis à jour une propagation bidirectionnelle de la protéine entre les systèmes nerveux central et périphérique, apportant de nouvelles preuves solides à l'hypothèse « prion-like » des synucléinopathies. Enfin, ces travaux ont également permis de démontrer de l'intérêt d'augmenter la clairance de la protéine pathologique comme stratégie thérapeutique commune et efficace à toutes les synucléinopathies.

Par ces travaux de recherche, j'ai ainsi pu contribuer à l'amélioration des connaissances dans la mécanistique des synucléinopathies et à la recherche de stratégies thérapeutiques efficaces pour ces pathologies, démontrant tout le long de l'intérêt d'une approche translationnelle dans l'étude des maladies neurodégénératives. De par leurs points communs cliniques et neuro-anatomopathologiques, il semble pertinent de penser à des mécanismes sous-jacents délétères communs et donc à une recherche de stratégies thérapeutiques communes pour toutes les synucléinopathies, tout en tenant compte de la spécificité cellulaire de chacune des pathologie (i.e neuronale pour la maladie de Parkinson et oligodendrogliale pour l'atrophie multisystématisée). La neurodégénérescence induite par l' α -syn étant multifactorielle, concevoir un protocole expérimental multiparamétrique permettrait une compréhension plus rapide dans la temporalité et les liens de cause à effet des événements cellulaires amenant à la mort cellulaire dans ces maladies. Cependant, la difficulté de la mise en place d'un tel scénario expérimental et le manque d'approche intégrative ralentissent la compréhension totale et l'identification de tous les acteurs jouant un rôle dans ces pathologies complexes. De même, soigner ces maladies par une approche simple paraît illusoire et il semble évident qu'une combinaison thérapeutique alliant plusieurs approches et cibles cellulaires serait la clef pour répondre au besoin de traitement curatif pour ces pathologies. Enfin, ces maladies étant de nature progressive, le stade pathologique de chaque patient devra probablement être pris en compte, renforçant le besoin de biomarqueurs dans le domaine. Ainsi, malgré les preuves de connaissances grandissantes et la recherche de thérapie toujours plus précise, de nombreuses études restent à être menées dans les prochaines années dans un effort individuel et collectif scientifique avant de pouvoir proposer aux patients et à la société un traitement curatif efficace pour lutter contre les synucléinopathies.

ARTICLES DIDACTIQUES

Les synucléinopathies sont-elles des maladies à prions ?



Are synucleinopathies prion-like disorders?

M.-L. Arotcarena^{a,b}
B. Dehay^{a,b}

^aUniversité de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, 2 CNRS UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

^bCNRS UMR 5293, institut des maladies neurodégénératives, 33000 Bordeaux, France

RÉSUMÉ

Les synucléinopathies regroupent l'ensemble des maladies neurodégénératives dont les cellules du système nerveux présentent des inclusions intracytoplasmiques d'alpha-synucléine sous forme agrégée. La maladie de Parkinson, les démences à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée sont les synucléinopathies les plus répandues dans la population mondiale. Une nouvelle hypothèse émerge aujourd'hui selon laquelle les synucléinopathies seraient des maladies à prions. Cette revue discute les preuves cliniques et expérimentales qui suggèrent que l'alpha-synucléine présente des caractéristiques communes de type protéine prion : le changement de conformation de la protéine physiologique vers des formes pathogéniques sous forme agrégée ; la transmission de l'information pathogénique contenue dans la forme pathologique et la capacité à se propager d'une cellule à une autre vers de nouvelles structures cérébrales selon une topologie particulière à chaque pathologie. Cependant, l'absence de preuve du caractère infectieux de l'alpha-synucléine par une transmission inter-individuelle fait qu'elle ne peut être considérée comme une protéine prion mais est dite protéine « prion-like ». En l'état actuel des connaissances, les synucléinopathies ne peuvent être assimilées à des maladies à prions mais à des maladies dites « prion-like ».

© 2018 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

SUMMARY

Synucleinopathies are neurodegenerative diseases characterized by the presence of alpha-synuclein-positive intracytoplasmic inclusions in the central nervous system. Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy are the three most prevalent synucleinopathies worldwide. In recent decades, a new hypothesis regarding these diseases in which synucleinopathy would be considered to be a prion disease, has been raised. Here, we discuss clinical and experimental evidence suggesting that alpha-synuclein protein shares key features with prion protein: conformational change of the physiological the cytoplasmic form of alpha-synuclein into misfolded forms; seeding of alpha-synuclein pathogenic properties; disease topography-dependent cell-to-cell transmission and spreading of alpha-synuclein protein among neuronal regions. However, despite these common characteristics shared by alpha-synuclein and prion proteins, the infectivity criterion is missing, i.e. alpha-synuclein does not spread from person to person. In conclusion, to date, synucleinopathies cannot be considered to be prion diseases but should rather be called prion-like diseases.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

LES SYNUCLÉINOPATHIES

Le terme synucléinopathie regroupe l'ensemble des pathologies neurodégénératives caractérisées par une accumulation anormale de la protéine α -synucléine (α -Syn) sous sa forme agrégée dans les neurones, dans les

terminaisons nerveuses ou bien dans les cellules gliales du système nerveux central.

La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est la synucléinopathie la plus répandue dans la population mondiale avec une prévalence de

MOTS CLÉS

Synucléinopathies
Prion
Alpha-synucléine

KEYWORDS

Synucleinopathies
Prion
Alpha-synuclein

Auteur correspondant :

B. Dehay,
CNRS UMR 5293, centre Broca-Nouvelle-Aquitaine, institut des maladies neurodégénératives, université de Bordeaux, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.
Adresse e-mail :
benjamin.dehay@u-bordeaux.fr

570/100 000 parmi des personnes âgées de plus de 50 ans [1]. Les patients atteints de la MP présentent une triade de symptômes cliniques dits parkinsoniens : akinésie, rigidité et tremblement de repos. Ces symptômes moteurs s'accompagnent de signes non moteurs tels que des troubles olfactifs, dysautonomiques, du sommeil, de l'humeur et cognitifs dont certains peuvent survenir avant les symptômes moteurs. Le facteur de risque le plus important de développer la MP est l'avancement en âge, à partir de 60 ans. Cependant, des formes familiales génétiques de la maladie existent avec des patients déclarant une pathologie plus précocement (avant 40 ans) et présentant dans leur génome l'une des mutations dans le gène *SNCA* (A53T, A30P, E46K, H50Q, G51D ou A53E) ou bien une duplication/triplication du gène *SNCA* codant pour l' α -Syn humaine, suffisante par elle-même pour initier la pathologie. Au niveau neuropathologique, ces patients présentent deux caractéristiques importantes :

- une perte neuronale dopaminergique au niveau de la substance noire pars compacta (SNpc) entraînant un déficit en dopamine au niveau du striatum, à l'origine des symptômes moteurs ;
- la présence d'inclusions intracytoplasmiques neuronales appelées corps de Lewy (Lewy body [LB]) et neurites de Lewy (Lewy neurite [LN]) dont la protéine α -Syn est l'un des composants protéiques majoritaires [2].

La démence à corps de Lewy

La démence à corps de Lewy (DLB) est la deuxième synucléinopathie la plus répandue mais diffère de la MP cliniquement par la prédominance des troubles cognitifs qui sont présents très tôt en plus de certains symptômes moteurs. Au niveau pathologique, elle présente des caractéristiques communes à la MP avec des LB et des LN et une perte neuronale dopaminergique dans la SNpc. Elle se distingue surtout de la MP par la présence de dépôts de plaques amyloïdes au niveau cortical [2].

L'atrophie multisystématisée

L'atrophie multisystématisée (AMS) est une synucléinopathie plus rare en termes de prévalence (1–9/100 000). Cliniquement, on distingue deux phénotypes : certains patients présentent majoritairement un syndrome parkinsonien et sont classés comme AMS parkinsoniens (AMS-p), d'autres présentent majoritairement un syndrome cérébelleux (ataxie à la marche avec dysarthrie cérébelleuse, ataxie des membres et/ou dysfonction oculomotrice), et sont classifiés comme AMS cérébelleux (AMS-c).

Des symptômes autonomes sont aussi présents et impliquent le système gastro-intestinal, urogénital et cardiovasculaire. L'AMS est caractérisée au niveau neuro-anatomique par la présence d'inclusions intracytoplasmiques dans les oligodendrocytes [Glial cytoplasmic inclusion (GCI)] répandus dans tout le système nerveux central. Plus rarement, des inclusions intraneuronales sont aussi présentes. Dans les AMS-p, la zone la plus affectée fonctionnellement est la voie nigro-striatale (SNpc et striatum) tandis que dans les AMS-c, il s'agit du système olivo-pontocérébelleux. Cependant, au fil de l'évolution de la maladie, les deux phénotypes se chevauchent avec une très forte présence de ces inclusions au niveau du putamen, du pont, du cortex moteur et de la substance blanche accompagnée d'une perte neuronale observée dans la SNpc, le pont et les cellules de Purkinje cérébelleuses [2].

LA PROTÉINE ALPHA-SYNUCLÉINE

Même si elles diffèrent toutes cliniquement, ces trois pathologies démontrent une présence d'inclusions intracytoplasmiques neuronales ou gliales, immunopositives pour la protéine α -Syn. L' α -Syn est une protéine de 14 kDa (140 acides aminés) codée par le gène *SNCA* sur le chromosome 4 du génome humain. Elle est exprimée dans tout le système nerveux central et bien que son rôle physiologique exact ne soit pas encore totalement établi, il semble qu'elle soit impliquée au niveau des transmissions synaptiques neuronales et au niveau du métabolisme énergétique neuronal. La séquence de l' α -Syn est divisée en trois parties : la région N-terminale (acide aminé 1–60) contient six domaines de répétition riches en lysine et est impliquée dans la liaison aux lipides membranaires, la région centrale (acide aminé 61–95) est responsable de la capacité agrégative de la protéine et le domaine C-terminal (acide aminé 96–140) est composé de résidus chargés et contient notamment le site de phosphorylation au niveau de la sérine 129, site marqueur pathogénique de la protéine.

LES MALADIES À PRIONS ET LE CONCEPT DE PRION

Les maladies à prions appelées aussi encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) sont des maladies neurodégénératives infectieuses caractérisées par une vacuolisation des neurones entraînant des troubles moteurs et cognitifs chez les patients. Ces EST peuvent être sporadiques, génétiques ou acquises. Elles touchent aussi bien l'homme avec notamment le Kuru ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob que les animaux d'élevage ou sauvages avec pour les plus connues : la tremblante chez les ovins ou bien l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou « maladie de la vache folle » chez les bovins [3]. En 1982, Colby et Prusiner décrivent la nature protéique de l'agent infectieux dit Prion pour « *proteinaceous infectious particle* » avant d'identifier le gène *PRNP* chez l'homme codant pour la protéine prion cytoplasmique (PrP^C), exprimée de manière ubiquitaire chez l'homme. Chez un individu infecté, la protéine PrP^C subit une modification conformationnelle entraînant son caractère pathologique, elle est alors appelée PrP^{Sc} scrapie (PrP^{Sc}). Dans cette nouvelle conformation, la protéine PrP^{Sc} présente une structure riche en feuillettes β , s'agrège vers une forme dite amyloïde, qui s'accumule au sein des neurones et dans le système nerveux central entraînant ainsi la neurodégénérescence observée chez les patients. Au cours d'une infection d'une nouvelle cellule ou bien d'un nouvel individu, la protéine infectieuse PrP^{Sc} pathologique recrute et entraîne le changement de conformation de la protéine PrP^C physiologique dans la cellule hôte. Cette transconformation et autoréplication de la protéine prion est une caractéristique importante de sa propagation au sein d'un individu ou de sa transmission à un autre individu. La protéine prion, de par son caractère infectieux, peut se transmettre d'un individu à l'autre et causer des épidémies par une transmission iatrogène de l'agent comme cela a pu être le cas chez l'homme après des injections d'hormones de croissance provenant de l'hypophyse de patients infectés de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Certaines souches de protéine prion peuvent franchir la barrière inter-espèce comme cela a pu être le cas dans les années 1980 avec la protéine prion de l'ESB qui s'est

transmise à l'homme causant des cas appelés variants de la maladie de Creutzfeldt-Jakob par ingestion de nourriture contaminée [3].

PREUVES CLINIQUES POST-MORTEM

Propagation de l'alpha-synucléine au sein du système nerveux central

En 2002, Braak et al. ont émis l'hypothèse d'un schéma d'évolution de la progression de la MP sur des critères neuropathologiques [4]. Ils ont ainsi comparé trois groupes :

- des cerveaux de cas sporadiques de la MP ($n = 41$) ;
- des cerveaux d'individus sans diagnostic clinique de la MP mais présentant des LB et des LN avec des caractéristiques immunohistochimiques identiques aux cas sporadiques de la MP et non liés à l'âge ($n = 63$) ;
- des cerveaux d'individus contrôles aux critères épidémiologiques des deux autres groupes sans antécédent de maladie psychiatrique ou neurologique et dont le tissu ne présentait pas de LB et LN au niveau du noyau dorsal moteur IX et X, lieu d'origine putatif de la MP ($n = 58$).

L'étude n'a inclus que des patients atteints de la MP présentant des inclusions au niveau du noyau dorsal moteur X et n'a porté que sur la caractérisation de la progression de la synucléinopathie en étudiant la présence, la localisation et la sévérité des lésions observables au niveau des cerveaux. Cette étude, bien que controversée par ses critères inclusifs [5], a mis en évidence une expansion topographique des LB et LN, suggérant une progression caudo-rostrale de la synucléinopathie associée à la MP, divisée en 6 stades : de la medulla oblongata vers les zones corticales et les zones sensorimotrices en passant par le mésencéphale et l'atteinte de la SNpc (*Annexe 1-a*). Trois stades neuropathologiques ont également été proposés pour la DLB : mésencéphalique, transitionnelle et néocorticale [6]. Pour l'AMS, trois stades neuropathologiques ont été décrits par Jellinger et al. pour chacun des phénotypes de l'AMS (*Annexe 1-b*) [7].

Propagation de l'alpha-synucléine à des neurones greffés

Dans les années 1990, l'espoir d'une thérapie par greffe ectopique de neurones dopaminergiques embryonnaires au niveau du striatum pour les patients parkinsoniens a amené trois groupes indépendants à faire une découverte fondamentale inattendue, plusieurs années plus tard, étayant l'hypothèse d'un mécanisme de type prion de la protéine α -Syn [8–10]. Trois des huit patients étudiés présentaient des LB dans le cytoplasme des neurones transplantés avec des morphologies et des caractéristiques immunohistochimiques semblables aux LB présents dans les neurones hôtes des patients (positifs pour l' α -Syn, pour l'ubiquitine, et pour la thioflavine S). Ces études ont permis d'apporter une preuve clinique d'une transmission intercellulaire de l'alpha-synucléine de la cellule hôte vers la cellule greffée.

L'hypothèse de l'origine entérique de la maladie de Parkinson

Le fait que les symptômes non moteurs tels que des troubles du système digestif soient présents chez la majorité des

patients parkinsoniens et ce, avant la présence de symptômes moteurs observables, renforce l'hypothèse d'une origine périphérique voire entérique de la MP. En 2006, Braak et al. mettent en évidence pour la première fois la présence d'inclusions intraneuronales positives pour l' α -Syn au niveau du plexus myentérique et sous-muqueux gastrique chez cinq individus pour qui le diagnostic de la MP avait été posé [11]. Plus récemment, Sanchez-Ferro et al. ont rapporté la présence de fibres positives pour l' α -Syn au niveau du système nerveux entérique dans 60,7 % des patients parkinsoniens (17 sur 28), 16,7 % des patients pré-symptomatiques (1 sur 6) et 4,3 % des sujets contrôles (1 sur 23), confortant ainsi l'hypothèse d'une possible origine entérique de la MP [12]. Les méthodes de détection de l' α -Syn au niveau des tissus gastriques restent à être confirmées de par le manque d'homogénéisation des techniques, de sensibilité et de spécificité de l'immunomarquage [13]. En 2017, une étude épidémiologique suédoise menée sur une cohorte de 9430 personnes dont 4930 avaient développé une MP suggère qu'une vagotomie effectuée dans les cinq années précédant le diagnostic de la maladie pourrait avoir des effets protecteurs (incidence annuelle : 61,8/100 000 pour les sujets vagotomisés contre 67,5/100 000 pour les sujets non opérés)[14]. Ces études très récentes restent à être confirmées par d'autres analyses de cohortes puisqu'à partir d'un même registre danois, Svensson et al. [15] indiquent une diminution du risque de développer la MP après une vagotomie totale alors que Tysnes et al. n'ont trouvé aucune association entre le fait d'avoir subi une vagotomie et un effet bénéfique vis-à-vis de l'apparition de la MP.

PREUVES EXPÉRIMENTALES DES PROPRIÉTÉS « PRION-LIKE » DE LA PROTÉINE α -SYN AU SEIN DES MODÈLES ANIMAUX DE SYNUCLÉINOPATHIES

Agrégation de la protéine alpha-synucléine

Dans sa forme physiologique, l' α -Syn se présente sous une forme monomérique non repliée et soluble ou sous forme d'un tétramère dans certaines conditions. Il a été démontré par des études de suivi cinétique in vitro que la protéine α -Syn possède la capacité naturelle de s'agréger en forme amyloïde, notamment grâce aux propriétés agrégatives de son domaine central riche en résidus hydrophobes [16]. Elle s'agrège alors sous différentes conformations à partir de sa forme monomérique, adoptant d'abord la forme de petits oligomères qui s'agrègent pour donner des protofibrilles riches en feuillets bêta, qui à leur tour s'assemblent pour donner des fibrilles composant les corps de Lewy [17]. Au sein des LB, l' α -Syn présente une conformation amyloïde thermodynamiquement stable, riche en feuillets β , présentant une première caractéristique commune avec la protéine prion, et spécifiquement phosphorylée au niveau de la sérine 129 (pSer129).

Propagation de l'alpha-synucléine

Propagation intercellulaire

L' α -Syn est retrouvée physiologiquement dans le liquide cébrospinal et dans les érythrocytes, et est également détectée chez des patients parkinsoniens. La première preuve expérimentale directe d'un transfert de l' α -Syn d'une cellule émettrice

vers une cellule hôte a été apportée par une étude de Desplats et al. en 2009 [18]. Dans cette étude, des modèles de co-culture de cellules de neuroblastomes humaines (SH-SY5Y) ont été utilisés avec une population donneuse exprimant l' α -Syn marquée et une deuxième population cellulaire ne surexprimant pas l' α -Syn. Après 24 h de co-culture, l' α -Syn marquée était présente dans les cellules acceptrices, démontrant une transmission de cellule à cellule de l' α -Syn dans ce système. Dans cette même étude [18], l'équipe a démontré pour la première fois un transfert de cellule à cellule de l' α -Syn dans un modèle in vivo. Un mois après la transplantation de cellules souches neuronales de souris GFP-positives dans l'hippocampe d'un modèle de souris transgéniques (lignée 61) surexprimant l' α -Syn humaine (sous le promoteur Thy-1), 15 % des cellules murines greffées présentait un marquage positif pour l' α -Syn humaine. Quelques années plus tard, Kordower et al. confirmaient cette transmission de cellules hôtes à cellules greffées sur un modèle in vivo de rat dans lequel des cellules embryonnaires de mésencéphale de rat étaient transplantées dans le striatum de rats préalablement lésés à la 6-OHDA [19].

Propagation inter-régionale

Ces premières démonstrations expérimentales de transmission cellule-à-cellule de l' α -Syn ont été renforcées par des études in vivo démontrant une transmission inter-régionale de la protéine. En 2012, Luk et al. ont injecté unilatéralement au niveau du striatum dorsal chez des souris sauvages, des inocula de fibrilles préformées (Pffs) provenant d' α -Syn recombinante [20]. Un mois après l'injection, des inclusions cytoplasmiques positives pour l' α -Syn et pour des marqueurs pathologiques (pSer129, thioflavin S, ubiquitine) étaient présentes au sein de neurones à proximité de la zone d'injection mais également au sein des régions interconnectées avec le striatum telles que les zones corticales, entraînant également

une perte (27,7 %) des neurones dopaminergiques de la SNpc et des déficits moteurs observables à six mois après l'injection. En 2014, Recasens et al. ont injecté unilatéralement au niveau de la SNpc de souris sauvages, des fractions de corps de Lewy purifiés provenant de cerveaux post-mortem de patients parkinsoniens [21]. Quatre mois plus tard, une neurodégénérescence nigro-striée au niveau de la SNpc et du striatum a été observée, associée à une présence d'agrégats d' α -Syn phosphorylés et résistants à la protéinase K dans les zones interconnectées au site d'injection. Dans cette étude, des injections ont également été réalisées chez deux singes, un au niveau de la SNpc et un autre au niveau du putamen, des fractions de LB identiques à ceux utilisés préalablement chez la souris. Après 14 mois, l'analyse post-mortem a montré :

- une perte d'innervation dopaminergique au niveau striatal (35 %) dans les 2 singes injectés et une neurodégénérescence au niveau de la substance noire (40 %), accentuée chez le singe ayant reçu l'injection striatale ;
- une propagation de la pathologie liée à l' α -Syn dans plusieurs zones interconnectées au site d'injection.

Cette étude apporte une nouvelle preuve dans le mécanisme de « prion-like » de la protéine α -Syn et de sa transmission et sa propagation dans le système nerveux central.

Propagation périphérique vs centrale

Récemment, une transmission antérograde de l' α -Syn périphérique du système nerveux central vers le système nerveux entérique, a été observée par l'équipe du Dr Di Monte dans un modèle de rat [22]. Six mois après l'injection d'un virus exprimant l' α -Syn humaine au niveau du mésencéphale dorsal des rats, les régions de la medulla oblongata (notamment les neurones du noyau dorsal moteur), mais également des sections du nerf vague et de la paroi de l'estomac présentaient un marquage positif

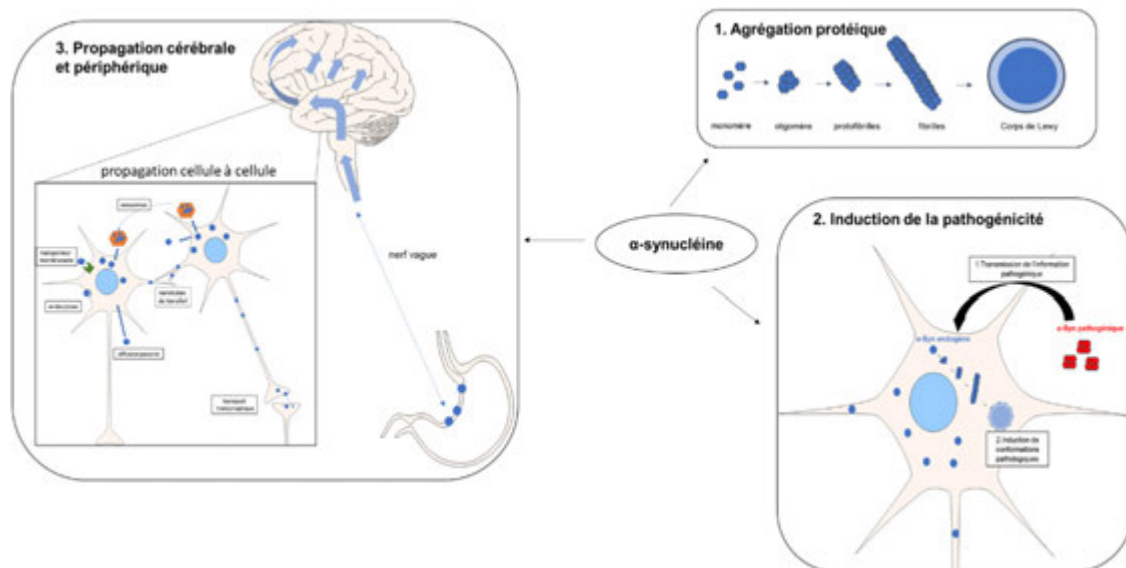


Figure 1. Propriétés « prion-like » de la protéine α -Syn.

pour l' α -Syn humaine. Cette même équipe a également mis en évidence une propagation rétrograde de la protéine α -Syn [23]. Dix-huit semaines après l'injection d'un virus exprimant l' α -Syn humaine au niveau du nerf vague gauche, l' α -Syn s'accumulait dans des zones interconnectées rostrales au nerf vague, notamment au niveau de la medulla oblongata, du mésencéphale jusqu'à la SNpc mais également au niveau du diencéphale avec l'hippocampe et l'amygdale.

Induction de la pathogénicité à la protéine endogène

L'équipe de Virginia Lee avec Volpicelli-Daley et al. a pu faire une première démonstration de l'induction pathogénique de l' α -Syn in vitro en ajoutant des Pffs provenant d' α -Syn humaine au milieu de culture de neurones primaires hippocampiques murins [24]. Après internalisation de ces Pffs portant l' α -Syn humaine pathogénique dans les cellules neuronales, une induction de la pathogénicité à l' α -Syn murine était observée avec la présence d'agrégats d' α -Syn murine aux caractéristiques communes aux inclusions de type LB (pSer129, insolubilité des agrégats, ubiquitinylation). En 2012, une preuve expérimentale in vivo a été apportée par la même équipe. Dans cette étude, après une injection de Pffs d' α -Syn humaine dans le striatum des souris sauvages, un recrutement de l' α -Syn endogène murine a été observé [20]. En 2014, Recasens et al. ont également observé une induction pathogénique dans leur modèle d'injection de fractions de LB provenant de cerveaux post-mortem de patients parkinsoniens [21]. Après l'injection de ces fractions au niveau de la SNpc chez des souris sauvages, l' α -Syn humaine contenue dans ces LB pénétrait dans les neurones dopaminergiques murins 24 h après injection. En revanche, une accumulation cytoplasmique d' α -Syn endogène murine, PK-résistante et phosphorylée, était observée au sein des neurones dopaminergiques de la SNpc quatre mois post-injection, suggérant ici l'induction pathogénique de l' α -Syn humaine vers l' α -Syn murine endogène. L'injection d'extraits de LB déplétés en α -Syn a confirmé la nécessité de la présence de l' α -Syn humaine dans l'initiation de l'induction pathogénique de l' α -Syn endogène. Par ailleurs, après l'injection des fractions de LB chez des souris transgéniques délétées pour la protéine endogène murine, aucune synucléinopathie et neurodégénérescence a été observée. Ces expériences ont pu renforcer l'hypothèse d'une induction pathogénique de l' α -Syn humaine pathologique à l' α -Syn murine endogène, amenant l' α -Syn endogène à adopter une conformation pathogénique. L'induction pathogénique de l' α -Syn a également été démontrée dans un modèle murin de DLB où des fractions insolubles d' α -Syn provenant de cerveaux post-mortem de patients atteints de DLB étaient injectées au niveau de la SNpc [25]. Enfin, après une injection d'homogénats de cerveaux provenant de patients atteints d'AMS diagnostiqués dans le lobe pariétal droit de souris TgM83, une transmission de la pathologie AMS à ces souris transgéniques a été démontrée, et absente lorsque l'injection est faite dans des souris sauvages [26].

Ces études, de par l'hétérogénéité de la nature du matériel inoculé, des concentrations injectées mais aussi des modèles utilisés, restent à être confirmées et homogénéisées. Cependant, elles démontrent d'un lien de cause à effet dans

lequel l'inoculation de la protéine α -Syn pathogénique entraîne des changements pathologiques au niveau de la protéine endogène, démontrant ici une autre caractéristique commune aux protéines prions. Malgré cette démonstration de causalité, l'interaction physique entre la protéine α -Syn pathogénique et endogène ainsi que le mécanisme de transmission de l'information pathogénique restent à être établis.

Transmission de l'alpha-synucléine inter-individu

La dernière caractéristique d'une protéine dite prion est sa capacité infectieuse et sa transmission d'un individu d'une même espèce à un autre ou vers une autre espèce. Aucune étude expérimentale n'a pu encore démontrer un caractère infectieux de l' α -Syn. Irwin et al ont mené une étude post-mortem sur une cohorte de 34 sujets (10 contrôles et 24 patients atteints de maladies neurodégénératives) ayant reçu un traitement hormonal de croissance dérivé d'hypophysés de patients atteints de maladies neurodégénératives pour rechercher la possibilité d'une transmissibilité inter-individuelle de pathologies neurodégénératives [27]. Cette étude n'a pas permis de relier un pouvoir infectieux du matériel biologique avec la transmission entre humains, que ce soit pour l' α -Syn pour les patients atteints de MP ou pour la protéine A β pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

À l'heure actuelle, cette absence de transmissibilité inter-individuelle, sous-entendant une propriété infectieuse de l' α -Syn, fait que l' α -Syn ne peut être assimilée qu'à une protéine « *prion-like* » et non pas à la protéine prion par définition, établissant que les synucléinopathies réfèrent à des maladies de type « *prion-like* ».

CONCLUSION

Ainsi, à ce jour, les preuves expérimentales et cliniques démontrent que l' α -Syn peut être considérée comme une protéine « *prion-like* » avec :

- le changement de conformation de la protéine physiologique vers des formes pathogéniques sous forme agrégée ;
- la transmission de l'information pathogénique contenue dans la forme pathologique ;
- et la capacité à se propager de cellule à cellule, ou vers de nouvelles structures cérébrales ou tissus périphériques selon une topologie particulière à chaque pathologie (Fig. 1).

Cependant, l'absence de caractère infectieux de l' α -Syn par une transmission entre humains fait que l' α -Syn ne peut être associée à une protéine avec les caractéristiques de type dite prion. En l'état actuel des connaissances, les synucléinopathies ne peuvent être assimilées à des maladies à prions mais seulement à des maladies dites « *prion-like* ». L'âge reste cependant le facteur de risque prédominant et le mécanisme de « *prion-like* » de la protéine α -Syn n'est pas suffisant par lui-même pour expliquer les effets pléiotropiques retrouvés dans les pathologies liées à l' α -Syn. Ainsi, la vulnérabilité neuronale et les mécanismes de vieillissement cellulaire (stress oxydatif, réduction de la protéostasie...) ne peuvent être écartés et joueraient un rôle participatif avec le mécanisme de « *prion-like* », notamment dans la possible distribution des zones et structures cérébrales affectées et la vitesse de propagation de la pathologie.

Points essentiels

- Les synucléinopathies sont des maladies neurodégénératives caractérisées par une accumulation intracytoplasmique de protéine alpha-synucléine sous forme agrégée au sein du système nerveux central.
- Les propriétés essentielles de la protéine prion sont :
 - le changement conformationnel de la protéine physiologique cytoplasmique PrP^c vers sa forme pathogénique PrP^{sc} avec une structure dite amyloïde, riche en feuillettes β, et capable de s'agrèger ;
 - la transmission de l'information pathogénique contenue dans la forme PrP^{sc} à la protéine physiologique PrP^c ;
 - sa capacité à se propager d'une cellule à une autre, infectant de nouvelles structures ou de nouveaux tissus selon une topologie particulière à chaque pathologie ;
 - et son caractère infectieux, référant à la transmission d'un individu à un autre au sein d'une même espèce ou même de franchir la barrière interspèce dans certains cas.
- Des preuves cliniques et expérimentales suggèrent que : l'alpha-synucléine possède des caractéristiques communes avec la protéine prion telles que : une forme pathogénique agrégée, une transmission de l'information pathogénique et une propagation au sein du système nerveux central, voire aux systèmes périphériques.
- Le caractère infectieux de l'alpha-synucléine n'est pas démontré ; ainsi, l'alpha-synucléine n'est pas une protéine prion par définition mais une protéine « prion-like ».
- Les synucléinopathies ne sont pas des maladies à prions mais des maladies « prion-like ».

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

ANNEXE 1. MATÉRIEL COMPLÉMENTAIRE

Le matériel complémentaire accompagnant la version en ligne de cet article est disponible sur <http://www.sciencedirect.com> et <https://doi.org/10.1016/j.praneu.2018.02.006>.

RÉFÉRENCES

- [1] Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2014;29(13):1583–90. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25945>.
- [2] McCann H, Stevens CH, Cartwright H, Halliday GM. α-Synucléinopathy phenotypes. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20:S62–7. [http://dx.doi.org/10.1016/s1353-8020\(13\)70017-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1353-8020(13)70017-8).
- [3] Colby DW, Prusiner SB. Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3(1):a006833. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006833> [PubMed PMID : 21421910 ; PubMed Central PMCID : PMC3003464].
- [4] Braak H, Rüb DTK, de Vos U, Jansen Steur RA, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2002;24(2):197–211.
- [5] Jellinger KA. A critical reappraisal of current staging of Lewy-related pathology in human brain. *Acta Neuropathol* 2008;116(1):1–16. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-008-0406-y> [PubMed PMID : 18592254].
- [6] McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor J-P, Weintraub D, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology* 2017;89(1):88–100. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000004058>.
- [7] Jellinger KA, Seppi K, Wenning GK. Grading of neuropathology in multiple system atrophy: proposal for a novel scale. *Mov Disord* 2005;20(S12):S29–36. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.20537>.
- [8] Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 2008;14(5):504–6. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1747> [PubMed PMID : 18391962].
- [9] Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008;14(5):501–3. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1746> [PubMed PMID : 18391963].
- [10] Mendez I, Viñuela A, Astradsson A, Mukhida K, Hallett P, Robertson H, et al. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med* 2008;14(5):507–9. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1752>.
- [11] Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006;396(1):67–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.012> [PubMed PMID : 16330147].
- [12] Sanchez-Ferro A, Rabano A, Catalan MJ, Rodriguez-Valcarcel FC, Fernandez Diez S, Herreros-Rodriguez J, et al. In vivo gastric detection of alpha-synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015;30(4):517–24. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25988> [PubMed PMID : 25113060].
- [13] Corbille AG, Letourmel F, Kordower JH, Lee J, Shanes E, Neunlist M, et al. Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods for the detection of Lewy-type synucleinopathy in gastrointestinal biopsies. *Acta Neuropathol Commun* 2016;4:35. <http://dx.doi.org/10.1186/s40478-016-0305-8> [PubMed PMID : 27044604 ; PubMed Central PMCID : PMC4820972].
- [14] Liu BF, Pedersen F, Tillander NL, Ludvigsson A, Ekblom JF, Svenningsson KA, et al. Vagotomy and Parkinson disease. A Swedish register-based matched-cohort study. *Neurology* 2017; 88:1–7. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000003961>.
- [15] Svensson E, Horváth-Puhó E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, et al. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2015;78(4):522–9. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.24448>.
- [16] Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 2001;276(4):2380–6. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M008919200> [PubMed PMID : 11060312].
- [17] Iljina M, Garcia GA, Horrocks MH, Tosatto L, Choi ML, Ganzinger KA, et al. Kinetic model of the aggregation of

- alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113(9):E1206–15. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1524128113>.
- [18] Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(31):13010–5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0903691106> [PubMed PMID : 19651612 ; PubMed Central PMCID : PMCPMC2722313].
- [19] Kordower JH, Dodiya HB, Kordower AM, Terpstra B, Paumier K, Madhavan L, et al. Transfer of host-derived alpha synuclein to grafted dopaminergic neurons in rat. *Neurobiol Dis* 2011;43(3):552–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2011.05.001> [PubMed PMID : 21600984 ; PubMed Central PMCID : PMCPMC3430516].
- [20] Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, et al. Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 2012;338(6109):949–53. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1227157> [PubMed PMID : 23161999 ; PubMed Central PMCID : PMCPMC3552321].
- [21] Recasens A, Dehay B, Bove J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Perez-Villalba A, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol* 2014;75(3):351–62. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.24066> [PubMed PMID : 24243558].
- [22] Ulusoy A, Phillips RJ, Helwig M, Klinkenberg M, Powley TL, Di Monte DA. Brain-to-stomach transfer of alpha-synuclein via vagal preganglionic projections. *Acta Neuropathol* 2017;133(3):381–93. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-016-1661-y> [PubMed PMID : 28012041 ; PubMed Central PMCID : PMCPMC5326583].
- [23] Ulusoy A, Rusconi R, Perez-Revuelta BI, Musgrove RE, Helwig M, Winzen-Reichert B, et al. Caudo-rostral brain spreading of alpha-synuclein through vagal connections. *EMBO Mol Med* 2013;5(7):1119–27. <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201302475> [PubMed PMID : 23703938 ; PubMed Central PMCID : PMCPMC3721477].
- [24] Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, et al. Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 2011;72(1):57–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.033> [PubMed PMID : 21982369 ; PubMed Central PMCID : PMCPMC3204802].
- [25] Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, et al. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 2013;136(Pt 4):1128–38. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awt037> [PubMed PMID : 23466394 ; PubMed Central PMCID : PMCPMC3613715].
- [26] Watts JC, Giles K, Oehler A, Middleton L, Dexter DT, Gentleman SM, et al. Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(48):19555–60. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1318268110> [PubMed PMID : 24218576 ; PubMed Central PMCID : PMCPMC3845125].
- [27] Irwin DJ, Abrams JY, Schonberger LB, Leschek EW, Mills JL, Lee VM, et al. Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone. *JAMA Neurol* 2013;70(4):462–8. <http://dx.doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.1933> [PubMed PMID : 23380910 ; PubMed Central PMCID : PMCPMC3678373].

Review

Autophagy in Synucleinopathy: The Overwhelmed and Defective Machinery

Marie-Laure Arotcarena ^{1,2,†}, Margaux Teil ^{1,2,†} and Benjamin Dehay ^{1,2,*} 

¹ Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France; marie-laure.arotcarena@u-bordeaux.fr (M.-L.A.); margaux.teil@u-bordeaux.fr (M.T.)

² CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

* Correspondence: benjamin.dehay@u-bordeaux.fr; Tel.: +33-(0)5-33-51-47-95; Fax: +33-(0)5-56-98-61-82

† These authors contributed equally to this work.

Received: 28 May 2019; Accepted: 8 June 2019; Published: 9 June 2019



Abstract: Alpha-synuclein positive-intracytoplasmic inclusions are the common denominators of the synucleinopathies present as Lewy bodies in Parkinson’s disease, dementia with Lewy bodies, or glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. These neurodegenerative diseases also exhibit cellular dyshomeostasis, such as autophagy impairment. Several decades of research have questioned the potential link between the autophagy machinery and alpha-synuclein protein toxicity in synucleinopathy and neurodegenerative processes. Here, we aimed to discuss the active participation of autophagy impairment in alpha-synuclein accumulation and propagation, as well as alpha-synuclein-independent neurodegenerative processes in the field of synucleinopathy. Therapeutic approaches targeting the restoration of autophagy have started to emerge as relevant strategies to reverse pathological features in synucleinopathies.

Keywords: Parkinson’s disease; multiple system atrophy; synucleinopathy; α -synuclein; macroautophagy; chaperone-mediated autophagy; mitophagy; neurodegeneration

1. Introduction

Synucleinopathies are neurodegenerative diseases characterized by the presence of alpha-synuclein (α -syn)-positive intracytoplasmic inclusions in the central nervous system (CNS), such as Parkinson’s disease (PD), multiple system atrophy (MSA), and dementia with Lewy bodies (DLB). PD is the most prevalent synucleinopathy worldwide, with 1–5% of the population over the age of 60 developing this disease [1]. PD is clinically characterized by a triad of motor symptoms (resting tremor, rigidity, and akinesia) caused by dopaminergic striatal depletion due to the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN). The major neuropathological hallmark of PD is the presence of α -syn-positive intracytoplasmic inclusions called Lewy Bodies (LB), which accumulate in neurons [2,3]. DLB is the second most prevalent synucleinopathy, clinically characterized by parkinsonian syndrome associated with cognitive deficits. DLB patients exhibit neurodegeneration in the SN, as well as LB deposition in the brain, but DLB differs from PD by the presence of amyloid plaques in cortical areas [2]. MSA is a rarer synucleinopathy, affecting 1–9/100,000 persons worldwide, divided into two clinical phenotypes: the MSA-parkinsonian with levodopa non-responsiveness parkinsonian syndrome due to neurodegeneration in the nigro-striatal pathway, and the MSA-cerebellar with gait, speech, and limb ataxia, as well as oculomotor dysfunction, due to neurodegeneration in the olivo-pontocerebellar system. As part of synucleinopathy, MSA patients’ brains exhibit α -syn-positive intracytoplasmic inclusions, which accumulate mainly in the oligodendrocytes, called glial cytoplasmic inclusions (GCI) [2].

Although synucleinopathy regroups heterogeneous clinical disorders, the neuropathological common denominator is the accumulation of the 140-amino acid protein, α -syn, in different brain regions of PD, DLB, and MSA patients. The α -Syn accumulation leads to the formation of misfolded α -syn species that aggregate in the cytoplasm, forming LB and GCI. Although the trigger phenomenon remains to be elucidated, three cellular factors have been suggested to play a role in α -syn aggregation: (i) increased expression of the *SNCA* gene encoding α -syn, (ii) post-translational modifications or mutations favoring α -syn aggregation, and (iii) impaired α -syn protein degradation. The α -Syn degradation is ensured by both the ubiquitin-proteasome system [4] and by the autophagy-lysosomal pathways (ALP) [5] protein degradation machinery. The signals responsible for targeting α -syn to either degradation pathway remain not fully understood.

ALP was shown to be implicated in the degradation of monomeric, small, soluble oligomeric species, as well as aggregated forms of the α -syn protein. ALP is a cellular proteolytic system which allows the degradation of long-lived proteins, protein aggregates, and abnormal organelles through both macroautophagy (MA) and chaperone-mediated autophagy (CMA) processes [6]. MA degrades cellular waste after the fusion of the autophagosomes carrying the material with the lysosome containing the enzymatic material [6]. CMA is a selective pathway that degrades proteins after recognition of pentapeptide (KFERQ-like motif) sequence by the cytosolic chaperone heat-shock cognate 70kDa protein (Hsc70) and delivery to the lysosome [6]. Here, we review clinical and experimental evidence focusing on PD and MSA, suggesting that defects in ALP machinery actively participate in α -syn accumulation in synucleinopathies and neurodegenerative pathological process.

2. Clinical Evidence of Autophagy Implication in Synucleinopathies

2.1. Genetic Evidence of Autophagic Involvement in Familial PD Cases

Genetic studies have been conducted for PD identifying familial forms of the disease representing approximately 10% of the PD cases with hereditary parkinsonism and earlier onset of the disease.

Among PD-linked genes, the first autosomal dominant mutation identified for PD was localized in the *PARK1/SNCA* gene encoding for the α -syn protein. This point mutation constitutes the A53T substitution in the *SNCA* gene, identified in Italian and Greek families [7]. In 1998, Kruger and collaborators identified the A30P point mutation in a German family [8] and the E46K point mutation was described in a Spanish family in 2004 by Zarranz and colleagues [9]. All these three *SNCA* point mutations were associated with α -syn accumulation and PD development, and were suggested to participate in autophagy impairment [10–12]. The autosomal dominant mutations in the *PARK8* gene encoding the leucine rich repeat kinase 2 protein (LRRK2) were reported to be the most known genetic cause of familial PD cases [13]. As LRRK2 is composed of multi-domain proteins, mutations in *PARK8* gene induce neurodegeneration by alteration in multiple cellular pathways, including the autophagy machinery [14]. The G2019S point mutation is the most common *PARK8* mutation, accounting for 5% of familial cases worldwide, and up to 42% of familial cases from North African Arab patients [15]. This mutation affected the kinase domain of the protein leading to impaired autophagy degradation. In 2006, two autosomal recessive mutations in the *PARK9* gene encoding for a lysosomal ATPase cation transporter (ATP13A2) in a Chilean family with early-onset Parkinson disorder were reported [16]. The ATP13A2 protein physiologically colocalizes with the lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP-2). The PD heterozygous *PARK9* mutations lead to an unstable truncated ATP13A2 protein, which is abnormally retained at the endoplasmic reticulum (ER) before its degradation [17]. Regarding genes involved in the CMA process, an autosomal recessive mutation in the *DNAJC6* gene, encoding DnaJ heat shock protein (Hsp) family member C6, was initially found in two members of a family in Palestine and was associated with fast-progressing parkinsonian syndrome [18]. Subsequent follow-up studies reported other *DNAJC6* mutations in families with very early-onset parkinsonism [18]. More recently, several groups also reported heterozygous mutations in the DnaJ heat shock protein family member C13 (*DNAJC13*) gene leading to pathological features resembling idiopathic PD [19].

Related to mitophagy-linked genes, *PARK2* gene encoding the E3-ubiquitin ligase protein Parkin was the second identified PD-linked gene with a large spectrum of autosomal recessive mutations observed in different familial cases [20–25]. Most of the *PARK2* mutations are deletions affecting the ubiquitin-like domain of the protein, disturbing the stabilization of other cellular proteins. The second mitophagy-linked gene constituted by *PARK6* gene mutations encoded the phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1 (PINK1) protein is found in 1–9% of familial PD cases [26–28]. The majority of *PARK6* mutations affected the kinase domain of the protein, leading to a loss-of-function of the protein, physiologically involved in eliminating damaged mitochondria. Finally, autosomal recessive mutations in *PARK7* gene encoding the DJ-1 protein are rarer and lead to its reduced antioxidant activity [29,30].

Besides PD-linked genes, genome-wide association studies pointed to some polymorphisms in genes that are associated with increased risk of developing PD. Among them, the *GBA* gene encoding the lysosomal enzyme β -glucocerebrosidase (GCase) and involved in glycolipid metabolism is a well-validated PD-associated risk factor [31]. *GBA* mutations cause an inherited autosomal recessive lysosomal storage disorder, known as Gaucher disease (GD), characterized by a loss-of function of the GCase protein leading to accumulation of glucocerebroside in different organs, such as the liver, the blood, the spleen, the lungs, and the nervous system. Interestingly, 8–14% of PD patients carried mutations in their genome, suggesting an increased risk of developing PD [32]. Similarly, patients with GD carrying heterozygous *GBA* mutations exhibited higher risks of developing PD [33]. Strikingly, a recent study discovered a significant burden of new susceptible loci, likely damaging lysosomal storage disorder gene variants in association with PD risk, reinforcing the importance of lysosomal mechanisms in PD pathogenesis [34].

As no genetic forms or polymorphisms have been reported in the literature so far for MSA, no genetic evidence regarding this other synucleinopathy can be reviewed here. Nevertheless, genetic studies on PD already indicate the potential role of autophagic processes into PD pathogenesis.

2.2. Post-Mortem Evidence of Autophagic Involvement in Synucleinopathies

Post-mortem studies have provided numerous pieces of evidence of autophagy impairment in pathologically affected areas of the brains of MSA and PD patients compared to age-matched controls. In 1997, Anglade and collaborators already observed an impairment in the autophagic process, noticing a drastic decrease of autophagic vacuoles in the nigral dopaminergic cells on PD post-mortem brains [35]. The most striking example highlighting an ALP impairment associated with α -syn accumulation in synucleinopathies is the presence of the microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3), an autophagosomal marker, within the LB of PD brains and within the GCI of MSA brains. In 2010, different groups showed that LC3 colocalized with LB and Lewy Neurites (LN) in the SN of PD patient brains [36], with an estimation of up to 40% of cortical LB [37] and up to 80% of nigral LB [38] being positive for LC3 in PD patients. Post-mortem studies on DLB patients—another synucleinopathy showing α -syn positive inclusions in cortical and cognitive areas—further corroborated this data, demonstrating co-immunostaining of LC3 with LB in the hippocampus [39] or in the temporal cortex [40]. Co-staining of LC3 and phosphorylated forms of α -syn in GCI were also observed in the oligodendrocytes of MSA brain patients [41], with up to 84% of colocalization found in pons tissue [42]. Taken together, these results suggest the accumulation and defective clearance of autophagosomes in synucleinopathies. In PD cases, Dehay and coworkers also observed that the transmembrane lysosomal transporter ATP13A2 is a component of LB in the SN of PD cases, as evidenced by 90% of ATP13A2 immunoreactivity in LB-positive dopaminergic neurons of the SN [43]. The autophagic regulator protein Beclin-1 was shown to be caspase-cleaved and increased in PD brains [44]. Finally, a more systemic autophagy impairment occurs in synucleinopathy, as both MA and CMA activity are decreased in cultured peripheral blood mononuclear cells of PD patients [45].

At a cellular level, alterations in the ALP could be explained by a decreased expression of the ALP transcription factor LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B) observed in melanized

dopaminergic neurons of post-mortem PD brains [46]. Among lysosomal components, the amount of the lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1) [47] and the ATP13A2 protein [43,48] are reduced in PD patients in comparison with age-matched controls, suggesting a defect in the MA process in PD pathogenesis. Corroborating this data, Dehay and colleagues described an impairment in the lysosomal-mediated clearance of autophagic vacuoles with an accumulation of autolysosomes containing non-degraded material in fibroblasts derived from PD patients harboring ATP13A2 loss-of-function mutations [43]. Pontocerebellar fibers of MSA patients showed increased staining of LAMP-1 and LAMP-2 with abnormal random distribution into the cytoplasm compared to control tissues, suggesting an MA impairment that is also involved in MSA pathogenesis [49]. Tanji and colleagues further demonstrated a decreased expression of the *GABARAP* gene encoding for the Gamma-aminotuberic acid receptor-associated protein and the *GABARAPL2* gene encoding for the Golgi-associated ATPase enhancer of 16KDa (GATE-16), which both play important roles in autophagosome formation associated with impaired maturation of the proteins in the cerebellum of MSA patients [41]. Finally, Compagnoni and colleagues demonstrated an autophagic activation with LC3-II accumulation in the cytoplasm of iPSCs derived from MSA patient skin fibroblasts associated with defect in lysosomal clearance [50], confirming impairment on the MA pathway.

Regarding the CMA pathway, Alvarez and colleagues demonstrated decreased protein levels only for the isoform type A of LAMP-2 (LAMP-2A) rate-limited protein for CMA process in the SN and the amygdala of PD patients, which is associated with decreased Hsp70 protein levels [36]. Corroborating this data, Murphy et al. (2015) showed that decreased levels of LAMP-2A and Hsc70 were associated with α -syn accumulation at the early stages of PD [51], and α -Syn protein was also shown to be colocalized with Hsc70 in the oligodendrocytes from MSA brains [52], confirming an impairment in the CMA machinery.

Finally, alterations in lysosomal enzymatic activities, involved in both MA and CMA processes, have been also described in post-mortem brains of patients suffering from synucleinopathies. The lysosomal GCcase enzyme activity was shown to be decreased in the cerebellum, the amygdala, the putamen, and the SN of PD brains from *GBA* mutation carriers [53]. Regarding sporadic cases, its activity is reduced in the cerebellum and in the SN by 24% and 33%, respectively [53], and in the caudate nucleus [54]. Its decreased activity was found to correlate with an increased α -syn amount at the early stages of the disease [55]. GCcase activity was also demonstrated to be decreased in the cerebrospinal fluid (CSF) of PD patients compared to controls [56,57], as well as a decrease in α -amminosidase [50,56] and α -fucosidase [58] activity and increase in β -hexosaminidase [57] and β -galactosidase [58] activity. Reduced activity of lysosomal hydrolase Cathepsin D (CathD) was observed in the SN of PD patients [47] or in ATP13A2 mutant fibroblasts derived from PD patients associated with defective processing of cathepsins [43]. In MSA cases, alterations in hydrolases were also observed with increased levels of CathD found in the pontocerebellar fibers [49] and in the white matter of the cerebellum [41].

In conclusion, post-mortem analysis of PD and MSA patients pointed out the ALP, macroautophagy, as well as CMA as be part of α -syn accumulation and neurodegenerative processes in synucleinopathies.

3. Dual-loop Between Autophagy and α -Syn Pathogenesis

Multiple pieces of evidence suggested that defective ALP processes could participate in α -syn accumulation, aggregation, and propagation into neuronal cells, thus confirming the role of deficient autophagy machinery in synucleinopathy.

3.1. ALP Processes Participate in α -Syn Accumulation and Aggregation

As suggested by genetic and post-mortem studies, ALP machinery is impaired in synucleinopathies and seems to be involved in α -syn accumulation. Of interest, multiple studies have provided evidence that ALP participates in α -syn degradation, in addition to the ubiquitin proteasome system.

In an α -syn transgenic mouse model, Klucken and collaborators observed the colocalization of α -syn positive inclusions with autophagic markers, such as LAMP-2 and LC3, as observed in patients' brains [59]. In fibroblasts derived from PD patients harboring a loss-of-function mutation in the *PARK9* gene, an accumulation of α -syn protein was observed in parallel with the accumulation of lysosomes and decreased proteolytic activity [43,60]. Knocking-down ATP13A2 expression in primary cortical neurons also enhanced accumulation of endogenous α -syn protein in addition to lysosomal degradation impairment, which can be reversed in part by the expression of wild-type (WT) ATP13A2 in ATP13A2 knockdown cells [60], confirming that α -syn is degraded by the lysosomes. Tsunemi and collaborators showed that *PARK9* deficiency leads to defective lysosomal exocytosis through impaired lysosomal Ca^{2+} levels contributing to intracellular α -syn accumulation [61]. This study suggested that ATP13A2 regulated neuronal lysosomal exocytosis, which modulates α -syn intracellular levels [61]. Recently, Sato and collaborators generated a Tyrosine-Hydroxylase cell-specific Atg7 conditional knock-out (KO) mouse model that presented α -syn accumulation and LB-like inclusions (positive for α -syn, p62, and ubiquitin) after autophagy impairment [62]. Thus, α -syn is degraded by ALP processes and several studies aimed to determine the contribution of MA and CMA pathways in α -syn degradation.

In PC12 cells that overexpress WT or mutated forms of α -syn (A30P, A53T), Webb and colleagues demonstrated that the induction of MA using the mTOR inhibitor rapamycin leads to an increased clearance of both WT and mutated forms of α -syn [63]. Conversely, increased levels of intracellular α -syn were observed after inhibition of the autophagosomal formation using the PI3K inhibitor 3-methyladenine (3-MA) or inhibition of the fusion of the autophagosomes with the lysosomes with BafilomycinA1 (Baf) [63,64]. In neuronal cells overexpressing WT α -syn, de novo α -syn aggregates colocalize with lysosomal markers CathD and LC3 [65]. Overexpression of Beclin-1 in this cellular model and in a transgenic α -syn mouse model leads to a decrease of α -syn aggregates but not monomeric forms, confirming an autophagic role in α -syn aggregate clearance [64,65]. On the contrary, Beclin-1 or Atg5 silencing in A53T- α -syn expressing neuroblastoma M17 cells induced a significant increase of α -syn oligomers and aggregates [66]. Altogether, these results suggest that the MA system is involved in clearance of α -syn oligomers or aggregates.

Interestingly, another study showed that clearance of human α -syn-aggregates induced by rotenone exposure to COS-7 cells is decreased after lysosomal inhibition using Baf treatment, but not after macroautophagic inhibition using 3-MA treatment [64]. Likewise, Cuervo and colleagues also demonstrated that rat ventral midbrain dopaminergic neurons exposed to 3-MA did not inhibit α -syn degradation, whereas a significant increase of α -syn half-life was observed after exposure to the lysosomal proteolysis inhibitor ammonium chloride [67]. These observations suggested that even if lysosomes are clearly involved in α -syn degradation, a non-macroautophagic pathway also took part in α -syn aggregates clearance [64]. Interestingly, the α -syn protein sequence contains the CMA-recognition motif VKKDQ [68]. Mutations in the CMA recognition motif of the α -syn protein sequence dramatically decreased its translocation to the lysosomal lumen [67]. In the same line of evidence, knocking-down the rate-limited CMA receptor LAMP-2A in rat embryonic cortical neurons increased detergent-soluble and -insoluble α -syn levels [69]. In vivo LAMP-2A silencing in dopaminergic cells in a rat model also induced autophagic defects with accumulation of autophagic vacuoles surrounded by α -syn punctates, which were positive for ubiquitin [70]. Altogether, this emphasized that CMA could be the non-macroautophagic pathway contributing also to α -syn degradation.

Additionally, the expression of micro RNA (miRNA) targeting LAMP-2A or Hsc70 CMA proteins in SHSY5Y cells also led to α -syn accumulation after defects in CMA [71,72]. Interestingly, these miRNAs, such as miR106a, miR320a, and miR301 (for Hsc70), or miR224 and miR373 (for LAMP-2A) levels are upregulated in the SN of PD patients, suggesting a CMA-mediated α -syn clearance defect in pathological conditions that could be involved in their accumulation and aggregation. Further confirming these results, addition of the chaperone protein DJ-1 to the α -syn solution inhibited the production of α -syn protofibrils, whereas the addition of L166P parkinsonism mutated DJ-1 failed to

from human CSF of LBD and PD patients compared to control subjects [87]. Isolation of exosomes from WT α -syn overexpressing SHSY5Y conditioned medium confirmed this association between α -syn and exosomes [88]. Incubation of naïve SHSY5Y cells to these α -syn-positive-exosomes showed the transmission of α -syn to the recipient cells [88,89]. The integrity of the exosomal compartment is essential for α -syn transmission, as its membrane disruption prevents the α -syn transmission to the donor cells [88,89]. Several studies confirmed this exosomal-mediated cell-to-cell α -syn transmission in vitro using different sets of co-culture techniques [89,90].

Interestingly, inhibition of autophagy using chemical treatments or Atg7-KO cells led to a significantly increased α -syn release in the conditioned media, and particularly in the exosomal fractions associated with increased levels of α -syn in recipient cells [88–90]. In contrast, activation of autophagy using rapamycin induced significant lower levels of α -syn exosomal release [88–90] and cell-to-cell transfer of α -syn in vitro. Systemic treatment of α -syn transgenic mice with Baf increased α -syn levels in the CSF, as well as neuronal death and neuroinflammation [91]. Likewise, injection of CSF-derived exosomes from LBD patients into mice brains increased the occurrence of α -syn-positive inclusion bodies in neurons, suggesting that the delivery of exosomal α -syn induces synucleinopathy [87]. These data suggest that autophagy impairment caused increased α -syn secretion and enhanced cell-to-cell transmission of α -syn via release of non-degraded α -syn-containing exosomes.

Further confirming this hypothesis, Tsunemi and collaborators demonstrated that fibroblasts from patients carrying *PARK9* mutation produced higher amounts of multivesicular endosomes with sparse intraluminal vesicles, which represent exosome precursors, suggesting that the ATP13A2 protein may control the exosomal process [92]. Using ATP13A2 overexpression in neuroblastoma H4 cells and primary neuronal cultures, they showed that α -syn levels are decreased in association with a higher production of exosomes, confirming that ATP13A2 plays a critical role in α -syn transport mediated by exosomes [92]. Kong and collaborators suggested that ATP13A2 mediates exosomal α -syn transmission by controlling zinc homeostasis in these vesicles [93]. Finally, *GBA* KO SHSY5Y cells accumulated intracellular α -syn and increased α -syn extracellular release, which was taken up by recipient naïve cells [94]. This phenomenon was reversed by overexpression of WT *GBA* in KO cells. Transplantation of *GBA* KO cells into the hippocampus of human α -syn transgenic mice showed that grafted cells were more sensitive to host-derived α -syn transfer [94]. Thus, reduced GCase activity by *GBA* mutation or in pathological conditions enhances the cell-to-cell transmission of α -syn.

Altogether, these studies demonstrated that autophagic impairment present in synucleinopathies could enhance α -syn cell-to-cell transmission by increasing the amount of non-degraded delivered exosomes to the extracellular media, thus aggravating the α -syn spreading into the CNS (Figure 1b).

3.3. α -Syn Induces Alterations on ALP Processes

Several studies also reported a detrimental role of the protein α -syn on ALP, further contributing to the pathology through an endless cycle of cellular alterations. PC12 cells overexpressing WT or mutated A53T α -syn protein showed abnormal morphology with accumulation of aberrant vesicular structures associated with diminished lysosomal activity, suggesting an impairment of the autophagy machinery in correlation with α -syn levels [95].

WT α -syn overexpression induced autophagy inhibition through impairment in autophagosome formation [96–98]. One possible mechanism relates to a decrease in α -syn-induced Rab1 activity, which, in turn, perturbs the localization of the Atg9 protein involved in autophagosome formation at the early stage of the biogenesis [97]. Song and collaborators suggested that α -syn-mediated autophagy inhibition was caused by the interaction between α -syn and the autophagic stimuli trigger HMGB1, associated with decreased Beclin-1 protein levels. This prevented the physiological cytosolic interaction between Beclin-1 and HMGB1 essential to activate autophagy [96]. Moreover, dopamine-modified α -syn showed inhibitory effects on the CMA activity by: (i) binding the LAMP-2A protein at the lysosomal membrane, (ii) forming oligomeric complexes at the lysosomal membrane, and (iii) being poorly translocated to the lysosomal lumen, thus blocking the degradation of other CMA cellular

substrates [98,99]. Finally, when α -syn transfers from cell to cell, autophagic impairment was also triggered in the recipient cell with an accumulation of enlarged deficient lysosomes, further contributing to the expansion of the pathology [100].

In parallel to WT α -syn effects on autophagy, pathologically mutant forms of α -syn induce alteration in ALP processes, per se. Overexpression of mutated A53T α -syn decreases the autophagy activity in PC12 cells. A53T α -syn lacking the CMA recognition motif expressed in the same cells did not alter autophagy activity, suggesting that the mutant A53T α -syn induced alterations only in the CMA-mediated degradation process [98]. In this situation, the MA pathway was upregulated to compensate for the CMA deficit but resulted in detrimental conditions that were partly responsible for the observed cell death. Disruption of CMA-mediated degradation induced by A53T α -syn also led to abnormal accumulation of the myocyte enhancer factor 2 (MEF2D) in the cytosol. This compromised its binding to DNA and its consequent role in gene regulation of multiple cellular functions, inducing cellular dyshomeostasis [101]. The mutant E46K α -syn induced impaired autophagy through inhibition of autophagosome formation in an mTOR-independent pathway [102]. It was suggested that E46K α -syn reduced the phosphorylation of Bcl2 protein through upstream JNK1 inactivation, provoking the sequestration and the loss-of-function of Beclin-1 in the Bcl2/Beclin-1 complex [102]. The mutant A30P α -syn was suggested to inhibit autophagy by increasing the translocation of the repressive autophagic transcription factor ZKSCAN3 to the nucleus in a JNK-dependent manner [11].

In α -syn preformed fibrils-treated HEK293T cells, phosphorylated α -syn (P- α -syn) colocalized with autophagosomal markers p62 and LC3II, but not with lysosomal marker LAMP-1, suggesting that α -syn inclusions are associated with autophagy machinery at the early stages [103]. Moreover, activation or inhibition of lysosomal activity did not alter the levels of P- α -syn, suggesting that matured α -syn aggregates were not efficiently degraded by the lysosomes. These cells also exhibit an impairment in autophagy with defective autophagosome maturation and delivery to the lysosomes. This work suggested that once α -syn aggregates are matured and the pathology is initiated, autophagy is no longer effective and is dysregulated by α -syn [103]. Detrimental effects of α -syn aggregates also occur through interaction of these aggregates with membrane lipids, inducing lysosomal membrane permeabilization and consequent impairment in autophagy [104,105].

In the lysosomal lumen, α -syn alters lysosomal hydrolases activity, such as Cathepsin B, GCCase, β -galactosidase, or β -hexosamidase, in midbrain neurons generated from iPSC cell line derived from healthy subjects transfected with WT α -syn or from idiopathic PD patients [77,106]. Strikingly, the levels of total cellular hydrolases were not altered, suggesting a problem in maturation and trafficking of the enzymes rather than a biosynthesis alteration. This idea was confirmed by experiments showing that α -syn modified the location of the key-regulator of ER-Golgi trafficking, Rab1, leading to disruption of the hydrolase trafficking at the Golgi compartment [106]. Interestingly, interaction of α -syn with GCCase at its active site in the lysosomal compartment [107], as well as decreased GCCase lysosomal activity in presence of WT or A53T α -syn due to alteration in protein maturation [77], further strengthened the risk-association of *GBA* mutations between PD and GD.

Finally, α -syn also dysregulates specific autophagy pathways, such as mitophagy. Choubey and colleagues showed that cortical neurons transfected with mutant A53T α -syn increased levels of healthy mitochondria colocalizing with autophagosomes, and were associated with decreased ATP levels that provoked bioenergetic deficits for the neuron [12]. In this situation, the physiological role of Parkin, which is to mark the mitochondria for their lysosomal addressing, is completely altered [12].

Altogether, these data suggested that the α -syn protein alters the ALP machinery through various deleterious pathways, thus participating in cellular dyshomeostasis and neuronal death, but also exacerbating the pathological synucleinopathy by a dual-loop effect (Figure 1b).

4. Role of Autophagy Impairment in Neurodegeneration

Since autophagy plays a role in the accumulation of α -syn, and in turn in the formation of a α -syn aggregates, its contribution in neurodegeneration must be questioned. Autophagic genes,

such as *Atg5* and *Atg7*, have been implicated in neurodegeneration. Both *Atg7* or *Atg5* conditionally KO mice displayed neuronal cell death, presence of ubiquitin-positive inclusions, and behavioral deficits [108–110], suggesting that autophagy impairment is implicated in neurodegeneration. In synucleinopathies, autophagy dysfunction has been observed through different mechanisms within the cell from the lysosomal stress, to mitophagy defect (a mitochondrial-centered autophagy), and finally in cellular trafficking disturbances that lead to neuronal loss.

4.1. Lysosomal Dysfunction

Neurons require a tight regulation and recycling of proteins involved, for the most part, in neurotransmission, making lysosomal efficacy that much more important for neuronal function and survival [111]. Correct completion of autophagy results in efficient cargo degradation via lysosomal digestion. Issues with lysosomal stress have been shown to affect the elimination of cargo.

Suitable autophagosomal degradation is based on the fusion of the autophagosomes with the lysosomes to be able to correctly degrade their content. Specific lysosomal proteins have been involved in the formation of the lysosome, such as LAMP-1 and LAMP-2. In LAMP-1 and LAMP-2 double-mutant mice, early embryonic death from E14.5 to E16.5 was observed with accumulation of autophagic vacuoles containing non-degraded material [112]. The same cellular disruptions were observed in fibroblast cell lines derived from these double mutant embryos, but lysosomal enzyme activity and protein degradation rates remained unchanged. These results suggest the important role of both LAMP proteins in lysosome formation that goes beyond structural maintenance of lysosomes.

Lysosomal destruction of the cargo requires a specific acidic environment to activate the hydrolases and proteases to, in turn, digest cargo. Neurotoxic agents such as MPP⁺ lead to the alkalinization of the lysosomal compartment associated with neurodegeneration [113]. In genetic PD models, such as ATP13A2 KO mice, not only does the loss of this protein cause a lysosomal alkalinization associated with a reduction of lysosomal proteolysis, but also triggers cell death [43]. In addition, when restoring this protein in dopaminergic cell lines, the reestablishment of lysosomal acidification and function leads to a decrease in cell death. Supplementary studies using ATP13A2-null mice were conducted and confirmed that ATP13A2 deficits were enough to induce neurodegeneration. Despite overexpressing α -syn in these mice, no pathology alterations were observed, indicating that ATP13A2 deficits act independently from α -syn [114].

Mutations in the LRRK2-encoding gene also indicated an impairment in the lysosomal pH and cathepsin activity [115]. LRRK2 G2019S mutations diminish lysosomal capacities and induce an enlargement of these organelles. These mutations also lead to an increased expression of ATP13A2, suggesting a link between these two lysosomal proteins associated with PD. The pathogenic mechanism originating from LRRK2 mutations remains unclear in PD pathogenesis. As LRRK2 KO mice present a little neurodegeneration in the brain [116], double knockouts of both LRRK proteins (LRRK1 and LRRK2) have been generated to elucidate the potential compensation of these proteins [117]. These double-mutant mice showed early mortality as well as dopaminergic cell loss accompanied by autophagy dysfunction, highlighting the importance of this protein in the regulation of ALP and neurodegeneration.

In line with acidification of the lysosomes, deficiencies in lysosomal proteases and hydrolases have been observed in PD models. First, mutations in the lysosomal protease CathD in *C. elegans*, as well as in mice, were shown to have a deleterious impact on autophagy and to cause the formation of α -syn aggregates and neurodegeneration in the CNS [118]. In addition, mutations in the *GBA1* gene have demonstrated parkinsonian symptoms linked to neurodegeneration [119]. In the case of MSA pathology, after differentiation of iPSC-derived dopaminergic neurons from MSA patients, impairment of autophagy and particularly of lysosomal enzymes were also observed [50].

The MPTP mouse model recapitulates some of the major features of PD, such as modifications in mitochondrial structure and function, reactive oxygen species (ROS) production, and activation of apoptotic pathways, which induce dopaminergic cell death. In this model, a pathogenic lysosomal

depletion occurs prior to an autophagosomal accumulation contributing to PD-related dopaminergic neurodegeneration [38].

Taken together, these studies emphasized the occurrence of lysosomal defects in in vitro and in vivo PD models as a key player in the initiation of neurodegeneration (Figure 2a).

4.2. Mitophagy Defects

Main cellular functions of the cell also reside in mitochondria, as they are the key organelles in the cell for the production of energy [120]. Defects in mitochondrial functions have been associated with genetic forms of synucleinopathies, particularly in PD with protein deficiencies, such as PINK1 and Parkin [121–124]. In the cell, degradation of mitochondria via the autophagic pathway, known as mitophagy, is essential for the elimination of defective mitochondria. When mitochondria are defective, there is recruitment of PINK1 to the outer membrane, where it accumulates and in turn phosphorylates Parkin, leading to its activation. The activation of Parkin induces the recruitment of a polyubiquitin chain. This polyubiquitin chain is then phosphorylated by PINK1, leading to the recruitment of autophagy receptors, activating the induction of autophagy and the clearance of the defective mitochondria [125].

In PD, this mitochondrial clearance does not function properly. Studies using deletions in genes of Parkin and PINK1 were first described in *Drosophila melanogaster* [121–123]. Given the central role of these two proteins in mitophagy, it is important to understand the contribution of this specific autophagic pathway in the induction of neurodegeneration. In Parkin-deleted adult mice, Stevens and colleagues observed declines in mitochondrial mass as well as age-dependent loss of dopaminergic neurons [126]. Recently, Sliter and collaborators showed that Parkin and PINK1 defects induced an inflammatory response that can play a role in neurodegeneration [127]. Nevertheless, the exact contribution of Parkin or PINK1 defective mitophagy in neurodegeneration need further exploration [128]. DJ-1, a PD-linked protein associated with familial cases, seems to also play a role in mitophagy, as it is able to rescue the phenotype of PINK1 mutants in *Drosophila*, but not in Parkin mutants. This suggests that DJ-1 could act between PINK1 and Parkin [129]. Interestingly, DJ-1 overexpression increased α -syn clearance and decreased neuronal death [130]. In DJ-1-deficient cells, increased levels of oxidative stress via glutathione inhibition were responsible for an increased sensitivity of cells to ROS, acting on the correct functions of the cell and its viability [131]. Loss of DJ-1 has also been shown to disrupt CMA, in addition to inducing mitochondrial defects [132]. Finally, Li and colleagues observed that *GBA* heterozygous mutations impair mitophagy by altering the mitochondrial priming to the lysosomes, indicating that *GBA* mutations not only affect ALP, but also mitochondrial recycling [133].

Thus, impairment of the mitophagy process seems to contribute to oxidative stress conditions, ultimately leading to neurodegeneration (Figure 2b).

4.3. Vesicular Trafficking Defects

Finally, trafficking defects have been observed in α -syn-related pathologies. Trafficking of endosomes and autophagosomes is essential in the autophagic pathway as it allows the transfer of the cargo to the ALP. VPS35 is implicated in endosomal trafficking. Mutations in VPS35 have been involved in late-onset PD [134]. In VPS35 PD-causing mutations, localization of the WASH complex within the endosomes was reduced and autophagy defects associated with cell death occurred [135]. WASH complex is involved in binding with retromers and inducing the formation of F-actin patches to guide cargo for transport. This complex has been shown to be involved in the induction of autophagy, particularly in the autophagosome formation step [135]. The VPS35 protein seemed to be essential in the regulation of the WASH complex to maintain cargo trafficking. Parkin has also emerged as a key player in endosomal trafficking. Williams and colleagues showed a novel interaction between Parkin and VPS35, in which Parkin mediated the ubiquitination of VPS35 [136]. VPS35 ubiquitination acts

directly on WASH-dependent cargo sorting and alters endosomal trafficking, thus affecting correct autophagic function, and finally playing a role in neurodegeneration.

The interaction between the two proteins Beclin-1 and Vps34, implicated in cargo trafficking, is the launching point to initiate autophagy. Huang and colleagues showed that HMGB1 protein played an indirect role on autophagy impairment via the malformation of the Beclin1-Vps34 complex in rotenone-treated cells, which inhibits autophagosome formation [137]. HMGB1 overexpression and rotenone exposure had the same effects on the cells—they induce cellular shrinkage and decrease cell viability.

As membrane components, lipid and cholesterol metabolism have also been shown to be players in vesicle integrity and trafficking. Cholesterol has been implicated specifically in autophagosome trafficking. Accumulation of cholesterol observed in *GBA1* N370S mutant fibroblasts leads to an accumulation of multilamellar bodies and a disruption of autophagy [138], increasing their susceptibility to apoptosis. In *GBA1*-deficient cells, an impairment of secretory autophagy can also be seen [139]. Lysosomal membrane ceramide species are produced by the GCase enzyme and then are converted into other lipids, such as fatty acids, by acid ceramidase [140]. Kim and colleagues overexpressed acid ceramidase in WT cells, which induced the accumulation of autophagic markers (p62, LC3, Rab7), as well as cell death [139]. Inhibiting acid ceramidase in *GBA1*-deficient cells led to a partial rescue of the lipid abnormalities, as well as decreased neurodegenerative markers [139]. Trafficking defects compromise autophagosomes delivery to the lysosomal compartment, thus inhibiting correct protein turnover, finally leading to neurodegenerative processes (Figure 2c).

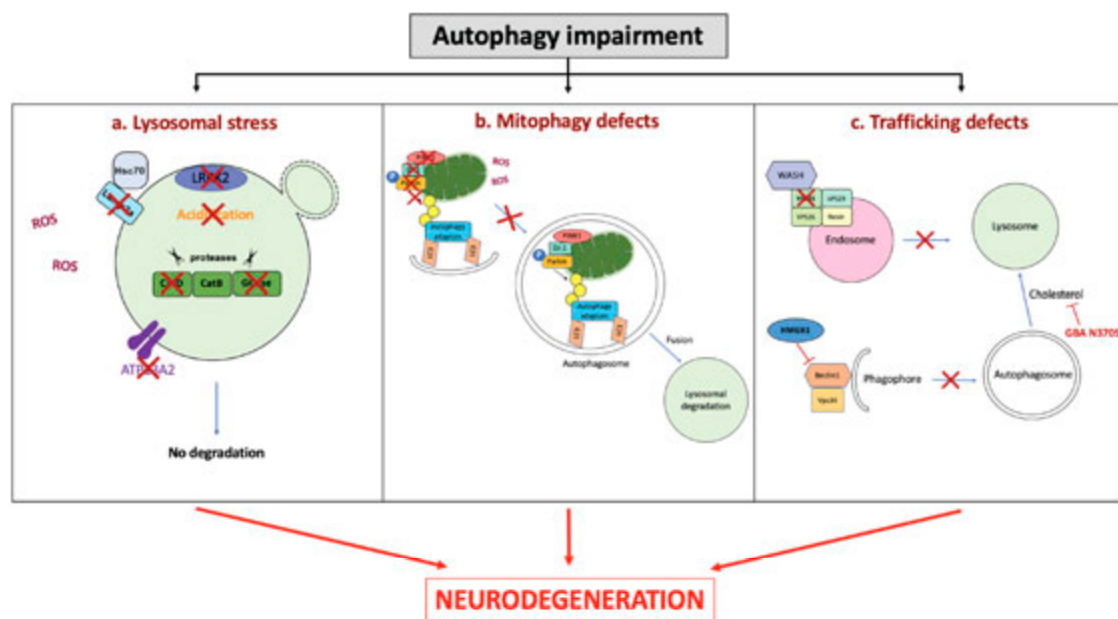


Figure 2. Autophagy impairment induces neurodegeneration. Autophagy can be impaired at different levels, namely: (a) Lysosomal stress; (b) mitophagy defects; (c) vesicular trafficking defects. (a) Lysosomal stress, characterized by either lysosomal alkalinization, lysosomal structural modifications, or defective lysosomal proteases, blocks the correct degradation of the cargo. (b) Mitophagy relies on actors such as PINK1, DJ-1, and Parkin, which allow a correct priming of defective mitochondria to be addressed to autophagy. Alterations in these proteins induce decreased mitophagy. (c) Vesicular trafficking is the starting point for the autophagosome formation through the recruitment of the WASH complex. Mutations in *VPS35* inhibits the WASH complex, and thus autophagosome formation. HMGB1 overexpression inhibits the Beclin1-Vps34 binding, and thus the phagophore formation. Mutations in *GBA* genes can also modify cholesterol, impairing autophagosome trafficking. GCase: β -glucocerebrosidase; CatD: Cathepsin D; ROS: reactive oxygen species.

5. Autophagy Recovery as a Therapeutic Target

We have reported here that ALP impairment plays a pivotal role in α -syn accumulation and release, as well as in neurodegenerative processes. Many studies have highlighted the importance of increasing autophagy activity or restoring its functionality as a therapeutic strategy in the field of synucleinopathies [141].

5. Autophagy Recovery as a Therapeutic Target

We have reported here that ALP impairment plays a pivotal role in α -syn accumulation and release, as well as in neurodegenerative processes. Many studies have highlighted the importance of increasing autophagy activity or restoring its functionality as a therapeutic strategy in the field of synucleinopathies [141].

5.1. mTOR-Dependent Targeting

ALP is regulated upstream by the mTOR protein, in which the inhibition activates autophagy. Molecules such as rapamycin increase mTOR inhibition, and thus increase the autophagy levels within the cell. This molecule has been tested in multiple models of PD, including, but not limited to, rotenone-exposed cells and MPP+-treated cells, MPTP mouse model, and α -syn transgenic rodents [40,142–144]. All these models have shown beneficial effects of rapamycin administration in both neurotoxin-induced PD models and α -syn overexpressing models. Specifically, there has been shown to be a reduction in dopaminergic cell death, decreased levels of phosphorylated α -syn, and reduced mitochondrial dysfunction. To target the mTOR pathway directly, some studies have also targeted the downstream mTOR target, transcription factor EB (TFEB). The mTOR inhibition activates the transport of TFEB to the nucleus, in which it binds DNA to regulate ALP gene expression [145]. Attempts at activating TFEB have been done through molecules such as FDA-approved 2-hydropropyl- β -cyclodextrin, which are capable of increasing autophagy levels, as well as α -syn clearance in neuroglioma cell lines [146]. Gene therapy using adeno-associated viral mediated TFEB overexpression in α -syn-overexpressing rat conferred a protective effect on rat midbrain neurons, associated with an increased clearance of pathologic α -syn through autophagic recovery [147]. Natural compounds such as pomegranate extracts enhanced TFEB activity, reversing the effects of α -syn mediated neurodegeneration in neuroblastoma cells through induction of both mitophagy and autophagy [148].

Neuroinflammation also contributes to neurodegeneration in synucleinopathies, but its role in triggering autophagy defects has not yet been completely elucidated. Nonetheless, innate immunity receptors, such as Toll-like receptors (TLR), have been suggested to play a role in neurodegeneration, as well as neuroinflammation, through autophagic dysregulation dependent on the mTOR pathway [149]. In fact, TLR2 expression has been shown to be increased in PD and LBD patients, as well as models of these diseases [150]. Activating TLR2 expression in vitro induced an accumulation of α -syn aggregates and increased neurotoxicity through autophagic dysregulation. On the other hand, knockdown of TLR2 in a mouse model of PD allowed an improvement in α -syn-induced pathology and alleviated motor deficits, suggesting that TLR2 can represent a novel interesting therapeutic target.

5.2. mTOR-Independent Targeting

Other molecules aimed to target mTOR-independent pathways through various mechanisms. A pioneer molecule for this strategy is the invertebrate disaccharide trehalose, which targets SLC2A transporters and induces an AMPK-dependent increase of autophagy. Trehalose has been tested in multiple models of PD, ranging from drug-induced pathology to α -syn overexpressing in vitro and in vivo models [100,151,152]. Using this molecule, there has been shown to be an increase in α -syn clearance, as well as a reduction in cell loss and neuroinflammation. Chronic treatments of natural caffeine molecules on α -syn fibrils-injected mice decreased α -syn positive inclusions, cellular apoptosis, microglial activation, and neuronal loss, all mediated by an increase in autophagy [153]. Lithium constitutes another strategy to enhance autophagy in an mTOR-independent pathway in different models via the inhibition of inositol phosphatase [154,155]. Lithium treatment was shown to increase the autophagy marker LC3 and to decrease the dopaminergic cell loss in the SN of MPTP mice [155]. Additionally, Hou and colleagues observed mitochondrial protection,

in addition to autophagy recovery, increasing cell viability after treatment of rotenone-exposed SH-SY5Y neuroblastoma cells with lithium [154]. Nonetheless, lithium is a molecule that is primarily used to treat bipolar disorders, indicating that possible unwanted side effects could emerge from the use of this molecule. Other molecules, such as calcium channel blockers, potassic ATP channel blockers (Minoxidil), and Gi signaling activators (Clonidine), have also been shown to be effective in inducing autophagy and clearing protein aggregates through regulation of cAMP levels [156]. Finally, inhibition of the autophagy blocker c-Abl using Nilotinib has been tested in PD patients who showed an increased clearance of α -syn in biological fluids associated with reduced symptomatology during clinical trials [157,158].

To target lysosomal activity directly, the use of acidic nanoparticles has been tested for their potential to restore lysosomal pH [113,159,160]. Bourdenx and colleagues tested the effect of nanoparticles in MPP⁺-treated cells, ATP13A2 mutant fibroblasts, and MPTP-treated mice. In all the mentioned models, the nanoparticles had the capacity to restore lysosomal pH, lysosomal function, and finally inhibit dopaminergic cell death in mice brains [113]. To mediate the lysosomal disruption caused by a loss-of-function of ATP13A2, strategies involving metal homeostasis have been used as therapeutic strategies. Tsunemi and coworkers recently observed that loss of ATP13A2 function in fibroblasts induced a Ca²⁺ dyshomeostasis in the lysosomes, in turn leading to exosomal disruptions and autophagic impairment [61]. TRPML1, the principal receptor responsible for Ca²⁺ import in lysosomes, was used as a target to modulate Ca²⁺ levels and restore correct function of this organelle. Other studies have also used strategies to target metals such as zinc, as well as cAMP to restore lysosomal acidification [161].

Knowing the importance of autophagy-related genetic mutations and associated protein loss-of-function in PD pathology, restoration of protein activity implicated in synucleinopathies have also demonstrated encouraging beneficial effects. Targeting GCase activity using ambroxol in *GBA1* mutant fibroblasts [162,163] restored lysosomal function and reduced oxidative stress. Preclinical trials using ambroxol are currently being conducted on PD dementia patients to observe the possible beneficial effects of this molecule on GCase activity and PD pathology [164]. Given the implication of Beclin-1 in inducing autophagy, targeting this protein to increase autophagic clearance has been tested in different models. Using activators of Beclin-1 in multiple PD models has been shown to increase α -syn clearance, decreasing cellular toxicity [65,165,166]. Despite the interaction of Beclin-1 with proteins able to induce apoptosis, such as Bcl2, the activation or overexpression of Beclin-1 has not seemed to increase the amount of cell death. Possibilities of targeting CMA are more limiting than targeting macroautophagy. Nonetheless, downstream factors of the CMA pathway could be an appealing alternative to macroautophagy. CMA targeting has principally been through the lysosomal marker LAMP-2A and its chaperone Hsc70. Overexpression of LAMP-2A has been induced in cellular models of PD using SH-SY5Y cells, in primary neuron cultures, as well as in rats [167]. In these models, an increase in the expression of the lysosomal protein LAMP-2A increased CMA activity, thus decreasing α -syn accumulation, allowing neuroprotection [167]. In addition to overexpressing LAMP-2A, retinoic acid receptors have been shown to be inhibitors of CMA. This inhibition decreased oxidative stress and protein toxicity, proving the interest of increasing the CMA pathway [168]. Mitochondrial oxidative stress also plays an important role in autophagy impairment in synucleinopathies. The antioxidant properties of the DJ-1 protein have been previously reported, as it could decrease oxidative stress and restore autophagy [169–171]. Increasing DJ-1 expression in astrocytes co-cultured with neurons proved to have beneficial effects against rotenone-induced cell oxidation [169]. This was also shown in vivo using a rotenone-treated rat model, where DJ-1 was specifically increased in astrocytes [172]. This DJ-1 overexpression allowed an inhibition of dopaminergic cell loss, a decrease in neuroinflammation, as well as an inhibition of CMA deficits. These studies indicate DJ-1 as an interesting genetic target because it acts at multiple levels of synucleinopathies: α -syn interaction, mitophagy activation, and oxidative stress reduction.

Pupyshev and colleagues, in an attempt to test the synergistic effect of mTOR-dependent and -independent targeting, combined the use of trehalose and rapamycin in a MPTP mouse model of PD [173]. By combining both molecules, this study showed an even more pronounced improvement in both the number of protected dopaminergic neurons and motor function recovery.

Knowing the crucial role that autophagy plays in the maintenance of cellular homeostasis, reestablishing its proper function in synucleinopathies was proven to be efficient in clearance of pathological α -syn aggregates and neuroprotection. However, this strategy could be detrimental to the well-being of neurons, as increasing the ALP could also target other proteins' elimination. Nevertheless, autophagy remains a promising and relevant target that could be at the source of possible therapies for synucleinopathies, as well as other protein accumulation-based neurodegenerative diseases.

6. Conclusions

Here, we summarized distinct pieces of evidence suggesting that autophagy is involved in synucleinopathy. The presence of autophagy alterations was first provided by genetic and post-mortem studies on brains of PD and MSA patients. Since then, experimental studies attempted to demonstrate the role of autophagy in the pathology of synucleinopathy. First, α -syn is mainly degraded by both macroautophagy and chaperone-mediated autophagy. Thus, autophagy defects induce intracellular α -syn accumulation, participating in its aggregative state towards the formation of α -syn-positive intracytoplasmic inclusions. In addition to this aggregative-prone phenomenon, autophagy defects also increase the α -syn secretion by the non-autophagic exosomal pathway, leading to increased cell-to-cell transmission of the protein, and thus the propagation of the α -syn-linked pathology in different brain regions of the CNS. On the other hand, autophagy defects also cause detriment effects in cellular homeostasis: (i) lysosomal impairment through structural or functional defects leads to accumulation of non-degraded products and increased production of ROS; (ii) decreased mitophagy leads to neuronal bioenergetic imbalance; and (iii) defective cargo trafficking impairs the addressing of vesicles to lysosomal clearance. All these detrimental cellular conditions lead to neurodegeneration. Finally, increased evidence demonstrated that inducing the autophagy pathways by natural or chemical compounds, as well as genetic approaches, has become a relevant therapeutic approach to counteract the deleterious effects of autophagy impairment in synucleinopathy.

Funding: This work was supported by Fondation de France Grant number 00066525, a France Parkinson Grant and an IDEX Emergence Grant number OPE-2018-410 (B.D.). M.L.A and M.T. are recipients of a MSER fellowship (France). The LABEX Brain, the University of Bordeaux, and the Centre National de la Recherche Scientifique provided infrastructural support.

Acknowledgments: We apologize to the authors of several high-quality scientific articles that contributed significantly to the development of the field, which could not be cited due to space limits.

Conflicts of Interest: The authors declared no conflict of interest.

Abbreviations

α -syn	α -synuclein
ALP	Autophagy-lysosomal pathway
Baf	BafilomycinA1
CathD	Cathepsin D
CMA	Chaperone-mediated autophagy
CSF	Cerebrospinal fluid
DLB	Dementia with Lewy bodies
ER	Endoplasmic reticulum
GABARAP	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GATE-16	Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa
GCase	β -glucocerebrosidase
GCI	Glial cytoplasmic inclusions

GD	Gaucher's Disease
Hsc70	Heat-shock cognate 70kDa
Hsp	Heat shock protein
KO	Knock-out
LAMP-1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LAMP-2	Lysosomal-associated membrane protein 2
LB	Lewy Bodies
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LMX1B	LIM homeobox transcription factor 1 beta
LN	Lewy neurites
MA	Macroautophagy
MEF2D	Myocyte enhancer factor 2
miRNA	micro RNA
MSA	Multiple system atrophy
P- α -syn	Phosphorylated α -synuclein
PD	Parkinson's Disease
PINK1	Phosphate and tensin homolog-induced putative kinase 1
ROS	Reactive oxygen species
SN	Substantia nigra
TFEB	Transcription factor EB
TLR	Toll-like receptor
WT	Wild-type
3-MA	3-methyladenine

References

- Pringsheim, T.; Jette, N.; Frolkis, A.; Steeves, T.D.L. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* **2014**, *29*, 1583–1590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- McCann, H.; Stevens, C.H.; Cartwright, H.; Halliday, G.M. α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2014**, *20*, S62–S67. [[CrossRef](#)]
- Emamzadeh, F.N.; Surguchov, A. Parkinson's Disease: Biomarkers, Treatment, and Risk Factors. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Snyder, H.; Mensah, K.; Hsu, C.; Hashimoto, M.; Surgucheva, I.G.; Festoff, B.; Surguchov, A.; Masliah, E.; Matouschek, A.; Wolozin, B. beta-Synuclein reduces proteasomal inhibition by alpha-synuclein but not gamma-synuclein. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7562–7569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rivero-Rios, P.; Madero-Perez, J.; Fernandez, B.; Hilfiker, S. Targeting the Autophagy/Lysosomal Degradation Pathway in Parkinson's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* **2016**, *14*, 238–249. [[CrossRef](#)]
- Scriver, A.; Bourdenx, M.; Pampliega, O.; Cuervo, A.M. Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 802–815. [[CrossRef](#)]
- Polymeropoulos, M.H.; Lavedan, C.; Leroy, E.; Ide, S.E.; Dehejia, A.; Dutra, A.; Pike, B.; Root, H.; Rubenstein, J.; Boyer, R.; et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **1997**, *276*, 2045–2047. [[CrossRef](#)]
- Kruger, R.; Kuhn, W.; Muller, T.; Woitalla, D.; Graeber, M.; Kosel, S.; Przuntek, H.; Epplen, J.T.; Schols, L.; Riess, O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 106–108. [[CrossRef](#)]
- Zarranz, J.J.; Alegre, J.; Gomez-Esteban, J.C.; Lezcano, E.; Ros, R.; Ampuero, I.; Vidal, L.; Hoenicka, J.; Rodriguez, O.; Atares, B.; et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* **2004**, *55*, 164–173. [[CrossRef](#)]
- Yan, J.Q.; Yuan, Y.H.; Chu, S.F.; Li, G.H.; Chen, N.H. E46K Mutant alpha-Synuclein Is Degraded by Both Proteasome and Macroautophagy Pathway. *Molecules* **2018**, *23*. [[CrossRef](#)]
- Lei, Z.; Cao, G.; Wei, G. A30P mutant alpha-synuclein impairs autophagic flux by inactivating JNK signaling to enhance ZKSCAN3 activity in midbrain dopaminergic neurons. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 133. [[CrossRef](#)]

12. Choubey, V.; Safiulina, D.; Vaarmann, A.; Cagalinec, M.; Wareski, P.; Kuum, M.; Zharkovsky, A.; Kaasik, A. Mutant A53T alpha-synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 10814–10824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zimprich, A.; Biskup, S.; Leitner, P.; Lichtner, P.; Farrer, M.; Lincoln, S.; Kachergus, J.; Hulihan, M.; Uitti, R.J.; Calne, D.B.; et al. Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron* **2004**, *44*, 601–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Martin, I.; Kim, J.W.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M. LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **2014**, *131*, 554–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lesage, S.; Dürr, A.; Tazir, M.; Lohmann, E.; Leutenegger, A.-L.; Janin, S.; Pollak, P.; Brice, A. LRRK2 G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in North African Arabs. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 422–423. [[CrossRef](#)]
16. Ramirez, A.; Heimbach, A.; Grundemann, J.; Stiller, B.; Hampshire, D.; Cid, L.P.; Goebel, I.; Mubaidin, A.F.; Wriekat, A.L.; Roeper, J.; et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 1184–1191. [[CrossRef](#)]
17. Edvardson, S.; Cinnamon, Y.; Ta-Shma, A.; Shaag, A.; Yim, Y.I.; Zenvirt, S.; Jalas, C.; Lesage, S.; Brice, A.; Taraboulos, A.; et al. A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36458. [[CrossRef](#)]
18. Deng, H.; Wang, P.; Jankovic, J. The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res. Rev.* **2018**, *42*, 72–85. [[CrossRef](#)]
19. Gustavsson, E.K.; Trinh, J.; Guella, I.; Vilarino-Guell, C.; Appel-Cresswell, S.; Stoessl, A.J.; Tsui, J.K.; McKeown, M.; Rajput, A.; Rajput, A.H.; et al. DNAJC13 genetic variants in parkinsonism. *Mov. Disord.* **2015**, *30*, 273–278. [[CrossRef](#)]
20. Hattori, N.; Kitada, T.; Matsumine, H.; Asakawa, S.; Yamamura, Y.; Yoshino, H.; Kobayashi, T.; Yokochi, M.; Wang, M.; Yoritaka, A.; et al. Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: Evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann. Neurol.* **1998**, *44*, 935–941. [[CrossRef](#)]
21. Hattori, N.; Matsumine, H.; Asakawa, S.; Kitada, T.; Yoshino, H.; Elibol, B.; Brookes, A.J.; Yamamura, Y.; Kobayashi, T.; Wang, M.; et al. Point Mutations (Thr240Arg and Ala311Stop) in the Parkin Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *249*, 754–758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kitada, T.; Asakawa, S.; Hattori, N.; Matsumine, H.; Yamamura, Y.; Minoshima, S.; Yokochi, M.; Mizuno, Y.; Shimizu, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **1998**, *392*, 605–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Leroy, E.; Anastasopoulos, D.; Konitsiotis, S.; Lavedan, C.; Polymeropoulos, M.H. Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Hum. Genet.* **1998**, *103*, 424–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lücking, C.B.; Abbas, N.; Dürr, A.; Bonifati, V.; Bonnet, A.M.; de Broucker, T.; De Michele, G.; Wood, N.W.; Agid, Y.; Brice, A. Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Lancet* **1998**, *352*, 1355–1356. [[CrossRef](#)]
25. Matsumine, H.; Saito, M.; Shimoda-Matsubayashi, S.; Tanaka, H.; Ishikawa, A.; Nakagawa-Hattori, Y.; Yokochi, M.; Kobayashi, T.; Igarashi, S.; Takano, H.; et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am. J. Hum. Genet.* **1997**, *60*, 588–596. [[PubMed](#)]
26. Valente, E.M.; Bentivoglio, A.R.; Dixon, P.H.; Ferraris, A.; Ialongo, T.; Frontali, M.; Albanese, A.; Wood, N.W. Localization of a Novel Locus for Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism, *PARK6*, on Human Chromosome 1p35-p36. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *68*, 895–900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Valente, E.M.; Brancati, F.; Caputo, V.; Graham, E.A.; Davis, M.B.; Ferraris, A.; Breteler, M.M.B.; Gasser, T.; Bonifati, V.; Bentivoglio, A.R.; et al. *PARK6* is a common cause of familial parkinsonism. *Neurol. Sci.* **2002**, *23*, s117–s118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Valente, E.M.; Brancati, F.; Ferraris, A.; Graham, E.A.; Davis, M.B.; Breteler, M.M.B.; Gasser, T.; Bonifati, V.; Bentivoglio, A.R.; De Michele, G.; et al. *Park6*-linked parkinsonism occurs in several European families. *Ann. Neurol.* **2002**, *51*, 14–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bonifati, V.; Rizzu, P.; van Baren, M.J.; Schaap, O.; Breedveld, G.J.; Krieger, E.; Dekker, M.C.J.; Squitieri, F.; Ibanez, P.; Joosse, M.; et al. Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science* **2003**, *299*, 256–259. [[CrossRef](#)]

30. Van Duijn, C.M.; Dekker, M.C.; Bonifati, V.; Galjaard, R.J.; Houwing-Duistermaat, J.J.; Snijders, P.J.; Testers, L.; Breedveld, G.J.; Horstink, M.; Sandkuijl, L.A.; et al. Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *69*, 629–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Hruska, K.S.; LaMarca, M.E.; Scott, C.R.; Sidransky, E. Gaucher disease: Mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 567–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Neumann, J.; Bras, J.; Deas, E.; O’Sullivan, S.S.; Parkkinen, L.; Lachmann, R.H.; Li, A.; Holton, J.; Guerreiro, R.; Paudel, R.; et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson’s disease. *Brain* **2009**, *132*, 1783–1794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sidransky, E.; Nalls, M.A.; Aasly, J.O.; Aharon-Peretz, J.; Annesi, G.; Barbosa, E.R.; Bar-Shira, A.; Berg, D.; Bras, J.; Brice, A.; et al. Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson’s Disease. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1651–1661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Robak, L.A.; Jansen, I.E.; van Rooij, J.; Uitterlinden, A.G.; Kraaij, R.; Jankovic, J.; International Parkinson’s Disease Genomics, C.; Heutink, P.; Shulman, J.M. Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson’s disease. *Brain* **2017**, *140*, 3191–3203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Anglade, P.; Vyas, S.; Javoy-Agid, F.; Herrero, M.; Michel, P.; Marquez, J.; Prigent, A.; Ruberg, M.; Hirsch, E.C.; Agid, Y. Apoptosis and Autophagy in Nigral Neurons of Patients with Parkinson’s Disease. *Histol. Histopathol.* **1997**, *12*, 25–31. [[PubMed](#)]
36. Alvarez-Erviti, L.; Rodriguez-Oroz, M.C.; Cooper, J.M.; Caballero, C.; Ferrer, I.; Obeso, J.A.; Schapira, A.H. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch. Neurol.* **2010**, *67*, 1464–1472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tanji, K.; Mori, F.; Kakita, A.; Takahashi, H.; Wakabayashi, K. Alteration of autophagosomal proteins (LC3, GABARAP and GATE-16) in Lewy body disease. *Neurobiol. Dis.* **2011**, *43*, 690–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dehay, B.; Bove, J.; Rodriguez-Muela, N.; Perier, C.; Recasens, A.; Boya, P.; Vila, M. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson’s disease. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 12535–12544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Higashi, S.; Moore, D.J.; Minegishi, M.; Kasanuki, K.; Fujishiro, H.; Kabuta, T.; Togo, T.; Katsuse, O.; Uchikado, H.; Furukawa, Y.; et al. Localization of MAP1-LC3 in Vulnerable Neurons and Lewy Bodies in Brains of Patients With Dementia With Lewy Bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2011**, *70*, 264–280. [[CrossRef](#)]
40. Crews, L.; Spencer, B.; Desplats, P.; Patrick, C.; Paulino, A.; Rockenstein, E.; Hansen, L.; Adame, A.; Galasko, D.; Masliah, E. Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9313. [[CrossRef](#)]
41. Tanji, K.; Odagiri, S.; Maruyama, A.; Mori, F.; Kakita, A.; Takahashi, H.; Wakabayashi, K. Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol. Dis.* **2013**, *49*, 190–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Schwarz, L.; Goldbaum, O.; Bergmann, M.; Probst-Cousin, S.; Richter-Landsberg, C. Involvement of macroautophagy in multiple system atrophy and protein aggregate formation in oligodendrocytes. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *47*, 256–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dehay, B.; Ramirez, A.; Martinez-Vicente, M.; Perier, C.; Cannon, M.H.; Doudnikoff, E.; Vital, A.; Vila, M.; Klein, C.; Bezdard, E. Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 9611–9616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Rohn, T.T.; Catlin, L.W. Immunolocalization of influenza A virus and markers of inflammation in the human Parkinson’s disease brain. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Papagiannakis, N.; Xilouri, M.; Koros, C.; Simitsi, A.M.; Stamelou, M.; Maniati, M.; Stefanis, L. Autophagy dysfunction in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson’s disease patients. *Neurosci. Lett.* **2019**, *704*, 112–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Laguna, A.; Schintu, N.; Nobre, A.; Alvarsson, A.; Volakakis, N.; Jacobsen, J.K.; Gomez-Galan, M.; Sopova, E.; Joodmardi, E.; Yoshitake, T.; et al. Dopaminergic control of autophagic-lysosomal function implicates Lmx1b in Parkinson’s disease. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 826–835. [[CrossRef](#)]
47. Chu, Y.; Dodiya, H.; Aebischer, P.; Olanow, C.W.; Kordower, J.H. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson’s disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *35*, 385–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Murphy, K.E.; Cottle, L.; Gysbers, A.M.; Cooper, A.A.; Halliday, G.M. ATP13A2 (PARK9) protein levels are reduced in brain tissue of cases with Lewy bodies. *Acta Neuropathol. Commun.* **2013**, *1*, 11. [[CrossRef](#)]
49. Makioka, K.; Yamazaki, T.; Takatama, M.; Nakazato, Y.; Okamoto, K. Activation and alteration of lysosomes in multiple system atrophy. *Neuroreport* **2012**, *23*, 270–276. [[CrossRef](#)]
50. Monzio Compagnoni, G.; Kleiner, G.; Samarani, M.; Aureli, M.; Faustini, G.; Bellucci, A.; Ronchi, D.; Bordoni, A.; Garbellini, M.; Salani, S.; et al. Mitochondrial Dysregulation and Impaired Autophagy in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons of Multiple System Atrophy. *Stem Cell Rep.* **2018**, *11*, 1185–1198. [[CrossRef](#)]
51. Murphy, K.E.; Gysbers, A.M.; Abbott, S.K.; Spiro, A.S.; Furuta, A.; Cooper, A.; Garner, B.; Kabuta, T.; Halliday, G.M. Lysosomal-associated membrane protein 2 isoforms are differentially affected in early Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2015**, *30*, 1639–1647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Chiba, Y.; Takei, S.; Kawamura, N.; Kawaguchi, Y.; Sasaki, K.; Hasegawa-Ishii, S.; Furukawa, A.; Hosokawa, M.; Shimada, A. Immunohistochemical localization of aggresomal proteins in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2012**, *38*, 559–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Gegg, M.E.; Burke, D.; Heales, S.J.; Cooper, J.M.; Hardy, J.; Wood, N.W.; Schapira, A.H. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann. Neurol.* **2012**, *72*, 455–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chiasserini, D.; Paciotti, S.; Eusebi, P.; Persichetti, E.; Tasegian, A.; Kurzawa-Akanbi, M.; Chinnery, P.F.; Morris, C.M.; Calabresi, P.; Parnetti, L.; et al. Selective loss of glucocerebrosidase activity in sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Mol. Neurodegener.* **2015**, *10*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Murphy, K.E.; Gysbers, A.M.; Abbott, S.K.; Tayebi, N.; Kim, W.S.; Sidransky, E.; Cooper, A.; Garner, B.; Halliday, G.M. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain* **2014**, *137*, 834–848. [[CrossRef](#)]
56. Balducci, C.; Pierguidi, L.; Persichetti, E.; Parnetti, L.; Sbaragli, M.; Tassi, C.; Orlacchio, A.; Calabresi, P.; Beccari, T.; Rossi, A. Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2007**, *22*, 1481–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Parnetti, L.; Chiasserini, D.; Persichetti, E.; Eusebi, P.; Varghese, S.; Qureshi, M.M.; Dardis, A.; Deganuto, M.; De Carlo, C.; Castrioto, A.; et al. Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2014**, *29*, 1019–1027. [[CrossRef](#)]
58. van Dijk, K.D.; Persichetti, E.; Chiasserini, D.; Eusebi, P.; Beccari, T.; Calabresi, P.; Berendse, H.W.; Parnetti, L.; van de Berg, W.D. Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2013**, *28*, 747–754. [[CrossRef](#)]
59. Klucken, J.; Poehler, A.M.; Ebrahimi-Fakhari, D.; Schneider, J.; Nuber, S.; Rockenstein, E.; Schlotzer-Schrehardt, U.; Hyman, B.T.; McLean, P.J.; Masliah, E.; et al. Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A 1-sensitive autophagy pathway. *Autophagy* **2012**, *8*, 754–766. [[CrossRef](#)]
60. Usenovic, M.; Tresse, E.; Mazzulli, J.R.; Taylor, J.P.; Krainc, D. Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, alpha-synuclein accumulation, and neurotoxicity. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 4240–4246. [[CrossRef](#)]
61. Tsunemi, T.; Perez-Rosello, T.; Ishiguro, Y.; Yoroisaka, A.; Jeon, S.; Hamada, K.; Krishna Vangipuram Suresh, M.; Wong, Y.C.; Xie, Z.; Akamatsu, W.; et al. Increased lysosomal exocytosis induced by lysosomal Ca(2+) channel agonists protects human dopaminergic neurons from alpha-synuclein toxicity. *J. Neurosci.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Sato, S.; Uchihara, T.; Fukuda, T.; Noda, S.; Kondo, H.; Saiki, S.; Komatsu, M.; Uchiyama, Y.; Tanaka, K.; Hattori, N. Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Webb, J.L.; Ravikumar, B.; Atkins, J.; Skepper, J.N.; Rubinsztein, D.C. α -Synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25009–25013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Lee, H.-J.; Khoshaghideh, F.; Patel, S.; Lee, S.-J. Clearance of α -Synuclein Oligomeric Intermediates via the Lysosomal Degradation Pathway. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 1888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Spencer, B.; Potkar, R.; Trejo, M.; Rockenstein, E.; Patrick, C.; Gindi, R.; Adame, A.; Wyss-Coray, T.; Masliah, E. Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 13578–13588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

66. Yu, W.H.; Dorado, B.; Figueroa, H.Y.; Wang, L.; Planel, E.; Cookson, M.R.; Clark, L.N.; Duff, K.E. Metabolic activity determines efficacy of macroautophagic clearance of pathological oligomeric alpha-synuclein. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 736–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Cuervo, A.M.; Stefanis, L.; Fredenburg, R.; Lansbury, P.T.; Sulzer, D. Impaired Degradation of Mutant α -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* **2004**, *305*, 1292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Mak, S.K.; McCormack, A.L.; Manning-Bog, A.B.; Cuervo, A.M.; Di Monte, D.A. Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 13621–13629. [[CrossRef](#)]
69. Vogiatzi, T.; Xilouri, M.; Vekrellis, K.; Stefanis, L. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 23542–23556. [[CrossRef](#)]
70. Xilouri, M.; Brekk, O.R.; Polissidis, A.; Chrysanthou-Piterou, M.; Kloukina, I.; Stefanis, L. Impairment of chaperone-mediated autophagy induces dopaminergic neurodegeneration in rats. *Autophagy* **2016**, *12*, 2230–2247. [[CrossRef](#)]
71. Alvarez-Erviti, L.; Seow, Y.; Schapira, A.H.; Rodriguez-Oroz, M.C.; Obeso, J.A.; Cooper, J.M. Influence of microRNA deregulation on chaperone-mediated autophagy and alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Li, G.; Yang, H.; Zhu, D.; Huang, H.; Liu, G.; Lun, P. Targeted suppression of chaperone-mediated autophagy by miR-320a promotes alpha-synuclein aggregation. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 15845–15857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Shendelman, S.; Jonason, A.; Martinat, C.; Leete, T.; Abeliovich, A. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Xu, C.Y.; Kang, W.Y.; Chen, Y.M.; Jiang, T.F.; Zhang, J.; Zhang, L.N.; Ding, J.Q.; Liu, J.; Chen, S.D. DJ-1 Inhibits alpha-Synuclein Aggregation by Regulating Chaperone-Mediated Autophagy. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Bae, E.J.; Yang, N.Y.; Lee, C.; Lee, H.J.; Kim, S.; Sardi, S.P.; Lee, S.J. Loss of glucocerebrosidase 1 activity causes lysosomal dysfunction and alpha-synuclein aggregation. *Exp. Mol. Med.* **2015**, *47*, e153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Cullen, V.; Sardi, S.P.; Ng, J.; Xu, Y.H.; Sun, Y.; Tomlinson, J.J.; Kolodziej, P.; Kahn, I.; Saftig, P.; Woulfe, J.; et al. Acid beta-glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter alpha-synuclein processing. *Ann. Neurol.* **2011**, *69*, 940–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Mazzulli, J.R.; Xu, Y.H.; Sun, Y.; Knight, A.L.; McLean, P.J.; Caldwell, G.A.; Sidransky, E.; Grabowski, G.A.; Krainc, D. Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* **2011**, *146*, 37–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Cleeter, M.W.; Chau, K.Y.; Gluck, C.; Mehta, A.; Hughes, D.A.; Duchen, M.; Wood, N.W.; Hardy, J.; Mark Cooper, J.; Schapira, A.H. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. *Neurochem. Int.* **2013**, *62*, 1–7. [[CrossRef](#)]
79. Xu, Y.H.; Sun, Y.; Ran, H.; Quinn, B.; Witte, D.; Grabowski, G.A. Accumulation and distribution of alpha-synuclein and ubiquitin in the CNS of Gaucher disease mouse models. *Mol. Genet. Metab.* **2011**, *102*, 436–447. [[CrossRef](#)]
80. Braak, H.; Del Tredici, K.; Rüb, U.; de Vos, R.A.; Jansen Steur, E.N.; Braak, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **2002**, *24*, 197–211. [[CrossRef](#)]
81. Kordower, J.H.; Chu, Y.; Hauser, R.A.; Olanow, C.W.; Freeman, T.B. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: A second case report. *Mov. Disord.* **2008**, *23*, 2303–2306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Li, J.Y.; Englund, E.; Holton, J.L.; Soulet, D.; Hagell, P.; Lees, A.J.; Lashley, T.; Quinn, N.P.; Rehncrona, S.; Bjorklund, A.; et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 501–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Mendez, I.; Viñuela, A.; Astradsson, A.; Mukhida, K.; Hallett, P.; Robertson, H.; Tierney, T.; Holness, R.; Dagher, A.; Trojanowski, J.Q.; et al. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 507–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Desplats, P.; Lee, H.J.; Bae, E.J.; Patrick, C.; Rockenstein, E.; Crews, L.; Spencer, B.; Masliah, E.; Lee, S.J. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl Acad Sci USA* **2009**, *106*, 13010–13015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

85. Recasens, A.; Dehay, B.; Bove, J.; Carballo-Carbajal, I.; Dovero, S.; Perez-Villalba, A.; Fernagut, P.O.; Blesa, J.; Parent, A.; Perier, C.; et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann. Neurol.* **2014**, *75*, 351–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Soria, F.N.; Pampliega, O.; Bourdenx, M.; Meissner, W.G.; Bezard, E.; Dehay, B. Exosomes, an Unmasked Culprit in Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.* **2017**, *11*, 26. [[CrossRef](#)]
87. Minakaki, G.; Menges, S.; Kittel, A.; Emmanouilidou, E.; Schaeffner, I.; Barkovits, K.; Bergmann, A.; Rockenstein, E.; Adame, A.; Marxreiter, F.; et al. Autophagy inhibition promotes SNCA/alpha-synuclein release and transfer via extracellular vesicles with a hybrid autophagosome-exosome-like phenotype. *Autophagy* **2018**, *14*, 98–119. [[CrossRef](#)]
88. Alvarez-Erviti, L.; Seow, Y.; Schapira, A.H.; Gardiner, C.; Sargent, I.L.; Wood, M.J.; Cooper, J.M. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* **2011**, *42*, 360–367. [[CrossRef](#)]
89. Danzer, K.M.; Kranich, L.R.; Ruf, W.P.; Cagsal-Getkin, O.; Winslow, A.R.; Zhu, L.; Vanderburg, C.R.; McLean, P.J. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol. Neurodegener.* **2012**, *7*, 42. [[CrossRef](#)]
90. Lee, H.J.; Cho, E.D.; Lee, K.W.; Kim, J.H.; Cho, S.G.; Lee, S.J. Autophagic failure promotes the exocytosis and intercellular transfer of alpha-synuclein. *Exp. Mol. Med.* **2013**, *45*, e22. [[CrossRef](#)]
91. Poehler, A.M.; Xiang, W.; Spitzer, P.; May, V.E.; Meixner, H.; Rockenstein, E.; Chutna, O.; Outeiro, T.F.; Winkler, J.; Masliah, E.; et al. Autophagy modulates SNCA/alpha-synuclein release, thereby generating a hostile microenvironment. *Autophagy* **2014**, *10*, 2171–2192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Tsunemi, T.; Hamada, K.; Krainc, D. ATP13A2/PARK9 regulates secretion of exosomes and alpha-synuclein. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 15281–15287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kong, S.M.; Chan, B.K.; Park, J.S.; Hill, K.J.; Aitken, J.B.; Cottle, L.; Farghaian, H.; Cole, A.R.; Lay, P.A.; Sue, C.M.; et al. Parkinson's disease-linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes alpha-Synuclein externalization via exosomes. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 2816–2833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Bae, E.J.; Yang, N.Y.; Song, M.; Lee, C.S.; Lee, J.S.; Jung, B.C.; Lee, H.J.; Kim, S.; Masliah, E.; Sardi, S.P.; et al. Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell transmission of alpha-synuclein. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Stefanis, L.; Larsen, K.E.; Rideout, H.J.; Sulzer, D.; Greene, L.A. Expression of A53T Mutant But Not Wild-Type α -Synuclein in PC12 Cells Induces Alterations of the Ubiquitin-Dependent Degradation System, Loss of Dopamine Release, and Autophagic Cell Death. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 9549–9560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Song, J.X.; Lu, J.H.; Liu, L.F.; Chen, L.L.; Durairajan, S.S.; Yue, Z.; Zhang, H.Q.; Li, M. HMGB1 is involved in autophagy inhibition caused by SNCA/alpha-synuclein overexpression: A process modulated by the natural autophagy inducer corynoxine B. *Autophagy* **2014**, *10*, 144–154. [[CrossRef](#)]
97. Winslow, A.R.; Chen, C.W.; Corrochano, S.; Acevedo-Arozena, A.; Gordon, D.E.; Peden, A.A.; Lichtenberg, M.; Menzies, F.M.; Ravikumar, B.; Imarisio, S.; et al. alpha-Synuclein impairs macroautophagy: Implications for Parkinson's disease. *J. Cell Biol.* **2010**, *190*, 1023–1037. [[CrossRef](#)]
98. Xilouri, M.; Vogiatzi, T.; Vekrellis, K.; Park, D.; Stefanis, L. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5515. [[CrossRef](#)]
99. Martinez-Vicente, M.; Talloczy, Z.; Kaushik, S.; Massey, A.C.; Mazzulli, J.; Mosharov, E.V.; Hodara, R.; Fredenburg, R.; Wu, D.C.; Follenzi, A.; et al. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 777–788. [[CrossRef](#)]
100. Hoffmann, A.C.; Minakaki, G.; Menges, S.; Salvi, R.; Savitskiy, S.; Kazman, A.; Vicente Miranda, H.; Mielenz, D.; Klucken, J.; Winkler, J.; et al. Extracellular aggregated alpha synuclein primarily triggers lysosomal dysfunction in neural cells prevented by trehalose. *Sci Rep.* **2019**, *9*, 544. [[CrossRef](#)]
101. Yang, Q.; She, H.; Gearing, M.; Colla, E.; Lee, M.; Shacka, J.J.; Mao, Z. Regulation of neuronal survival factor MEF2D by chaperone-mediated autophagy. *Science* **2009**, *323*, 124–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Yan, J.-Q.; Yuan, Y.-H.; Gao, Y.-N.; Huang, J.-Y.; Ma, K.-L.; Gao, Y.; Zhang, W.-Q.; Guo, X.-F.; Chen, N.-H. Overexpression of Human E46K Mutant α -Synuclein Impairs Macroautophagy via Inactivation of JNK1-Bcl-2 Pathway. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *50*, 685–701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

103. Tanik, S.A.; Schultheiss, C.E.; Volpicelli-Daley, L.A.; Brunden, K.R.; Lee, V.M. Lewy body-like alpha-synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 15194–15210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Freeman, D.; Cedillos, R.; Choyke, S.; Lukic, Z.; McGuire, K.; Marvin, S.; Burrage, A.M.; Sudholt, S.; Rana, A.; O'Connor, C.; et al. Alpha-synuclein induces lysosomal rupture and cathepsin dependent reactive oxygen species following endocytosis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Stefanovic, A.N.; Stockl, M.T.; Claessens, M.M.; Subramaniam, V. alpha-Synuclein oligomers distinctively permeabilize complex model membranes. *FEBS J.* **2014**, *281*, 2838–2850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Mazzulli, J.R.; Zunke, F.; Isacson, O.; Studer, L.; Krainc, D. alpha-Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 1931–1936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Yap, T.L.; Gruschus, J.M.; Velayati, A.; Westbroek, W.; Goldin, E.; Moaven, N.; Sidransky, E.; Lee, J.C. Alpha-synuclein interacts with Glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 28080–28088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Hara, T.; Nakamura, K.; Matsui, M.; Yamamoto, A.; Nakahara, Y.; Suzuki-Migishima, R.; Yokoyama, M.; Mishima, K.; Saito, I.; Okano, H.; et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **2006**, *441*, 885–889. [[CrossRef](#)]
109. Komatsu, M.; Waguri, S.; Chiba, T.; Murata, S.; Iwata, J.; Tanida, I.; Ueno, T.; Koike, M.; Uchiyama, Y.; Kominami, E.; et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **2006**, *441*, 880–884. [[CrossRef](#)]
110. Komatsu, M.; Wang, Q.J.; Holstein, G.R.; Friedrich, V.L., Jr.; Iwata, J.; Kominami, E.; Chait, B.T.; Tanaka, K.; Yue, Z. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14489–14494. [[CrossRef](#)]
111. Ferguson, S.M. Neuronal lysosomes. *Neurosci. Lett.* **2019**, *697*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Jäger, S.; Bucci, C.; Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E.; Saftig, P.; Eskelinen, E.L. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell. Sci.* **2004**, *117*, 4837–4848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Bourdenx, M.; Daniel, J.; Genin, E.; Soria, F.N.; Blanchard-Desce, M.; Bezard, E.; Dehay, B. Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implications for Parkinson and other lysosomal-related diseases. *Autophagy* **2016**, *12*, 472–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Kett, L.R.; Stiller, B.; Bernath, M.M.; Tasset, I.; Blesa, J.; Jackson-Lewis, V.; Chan, R.B.; Zhou, B.; Di Paolo, G.; Przedborski, S.; et al. alpha-Synuclein-independent histopathological and motor deficits in mice lacking the endolysosomal Parkinsonism protein Atp13a2. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 5724–5742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Henry, A.G.; Aghamohammadzadeh, S.; Samaroo, H.; Chen, Y.; Mou, K.; Needle, E.; Hirst, W.D. Pathogenic LRRK2 mutations, through increased kinase activity, produce enlarged lysosomes with reduced degradative capacity and increase ATP13A2 expression. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 6013–6028. [[CrossRef](#)]
116. Tong, Y.; Yamaguchi, H.; Giaime, E.; Boyle, S.; Kopan, R.; Kelleher, R.J., 3rd; Shen, J. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 9879–9884. [[CrossRef](#)]
117. Giaime, E.; Tong, Y.; Wagner, L.K.; Yuan, Y.; Huang, G.; Shen, J. Age-Dependent Dopaminergic Neurodegeneration and Impairment of the Autophagy-Lysosomal Pathway in LRRK-Deficient Mice. *Neuron* **2017**, *96*, 796–807. [[CrossRef](#)]
118. Qiao, L.; Hamamichi, S.; Caldwell, K.A.; Caldwell, G.A.; Yacoubian, T.A.; Wilson, S.; Xie, Z.L.; Speake, L.D.; Parks, R.; Crabtree, D.; et al. Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity. *Mol. Brain* **2008**, *1*, 17. [[CrossRef](#)]
119. Sardi, S.P.; Clarke, J.; Kinnecom, C.; Tamsett, T.J.; Li, L.; Stanek, L.M.; Passini, M.A.; Grabowski, G.A.; Schlossmacher, M.G.; Sidman, R.L.; et al. CNS expression of glucocerebrosidase corrects alpha-synuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 12101–12106. [[CrossRef](#)]
120. Lewis, M.R.; Lewis, W.H. Mitochondria in tissue culture. *Science* **1914**, *39*, 330–333. [[CrossRef](#)]
121. Greene, J.C.; Whitworth, A.J.; Kuo, I.; Andrews, L.A.; Feany, M.B.; Pallanck, L.J. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4078–4083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

122. Park, J.; Lee, S.B.; Lee, S.; Kim, Y.; Song, S.; Kim, S.; Bae, E.; Kim, J.; Shong, M.; Kim, J.M.; et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* **2006**, *441*, 1157–1161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Poole, A.C.; Thomas, R.E.; Andrews, L.A.; McBride, H.M.; Whitworth, A.J.; Pallanck, L.J. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 1638–1643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Brooks, J.; Ding, J.; Simon-Sanchez, J.; Paisan-Ruiz, C.; Singleton, A.B.; Scholz, S.W. Parkin and PINK1 mutations in early-onset Parkinson's disease: Comprehensive screening in publicly available cases and control. *J. Med. Genet.* **2009**, *46*, 375–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Youle, R.J.; Narendra, D.P. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 9–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Stevens, D.A.; Lee, Y.; Kang, H.C.; Lee, B.D.; Lee, Y.I.; Bower, A.; Jiang, H.; Kang, S.U.; Andrabi, S.A.; Dawson, V.L.; et al. Parkin loss leads to PARIS-dependent declines in mitochondrial mass and respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 11696–11701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Sliter, D.A.; Martinez, J.; Hao, L.; Chen, X.; Sun, N.; Fischer, T.D.; Burman, J.L.; Li, Y.; Zhang, Z.; Narendra, D.P.; et al. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature* **2018**, *561*, 258–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Corti, O. Neuronal Mitophagy: Lessons from a Pathway Linked to Parkinson's Disease. *Neurotox. Res.* **2019**. [[CrossRef](#)]
129. van der Merwe, C.; Jalali Sefid Dashti, Z.; Christoffels, A.; Loos, B.; Bardien, S. Evidence for a common biological pathway linking three Parkinson's disease-causing genes: Parkin, PINK1 and DJ-1. *Eur. J. Neurosci.* **2015**, *41*, 1113–1125. [[CrossRef](#)]
130. Zondler, L.; Miller-Fleming, L.; Repici, M.; Goncalves, S.; Tenreiro, S.; Rosado-Ramos, R.; Betzer, C.; Straatman, K.R.; Jensen, P.H.; Giorgini, F.; et al. DJ-1 interactions with alpha-synuclein attenuate aggregation and cellular toxicity in models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1350. [[CrossRef](#)]
131. Thomas, K.J.; McCoy, M.K.; Blackinton, J.; Beilina, A.; van der Brug, M.; Sandebring, A.; Miller, D.; Maric, D.; Cedazo-Minguez, A.; Cookson, M.R. DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 40–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Wang, B.; Cai, Z.; Tao, K.; Zeng, W.; Lu, F.; Yang, R.; Feng, D.; Gao, G.; Yang, Q. Essential control of mitochondrial morphology and function by chaperone-mediated autophagy through degradation of PARK7. *Autophagy* **2016**, *12*, 1215–1228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Li, H.; Ham, A.; Ma, T.C.; Kuo, S.H.; Kanter, E.; Kim, D.; Ko, H.S.; Quan, Y.; Sardi, S.P.; Li, A.; et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy defect triggered by heterozygous GBA mutations. *Autophagy* **2019**, *15*, 113–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Zimprich, A.; Benet-Pages, A.; Struhal, W.; Graf, E.; Eck, S.H.; Offman, M.N.; Haubenberger, D.; Spielberger, S.; Schulte, E.C.; Lichtner, P.; et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *89*, 168–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Zavodszky, E.; Seaman, M.N.; Moreau, K.; Jimenez-Sanchez, M.; Breusegem, S.Y.; Harbour, M.E.; Rubinsztein, D.C. Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Williams, E.T.; Glauser, L.; Tsika, E.; Jiang, H.; Islam, S.; Moore, D.J. Parkin mediates the ubiquitination of VPS35 and modulates retromer-dependent endosomal sorting. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 3189–3205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Huang, J.; Yang, J.; Shen, Y.; Jiang, H.; Han, C.; Zhang, G.; Liu, L.; Xu, X.; Li, J.; Lin, Z.; et al. HMGB1 Mediates Autophagy Dysfunction via Perturbing Beclin1-Vps34 Complex in Dopaminergic Cell Model. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Garcia-Sanz, P.; Orgaz, L.; Fuentes, J.M.; Vicario, C.; Moratalla, R. Cholesterol and multilamellar bodies: Lysosomal dysfunction in GBA-Parkinson disease. *Autophagy* **2018**, *14*, 717–718. [[CrossRef](#)]
139. Kim, M.J.; Jeon, S.; Burbulla, L.F.; Krainc, D. Acid ceramidase inhibition ameliorates alpha-synuclein accumulation upon loss of GBA1 function. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 1972–1988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Park, J.H.; Schuchman, E.H. Acid ceramidase and human disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 2133–2138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Lie, P.P.Y.; Nixon, R.A. Lysosome trafficking and signaling in health and neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* **2019**, *122*, 94–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

142. Pan, T.; Rawal, P.; Wu, Y.; Xie, W.; Jankovic, J.; Le, W. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience* **2009**, *164*, 541–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Bai, X.; Wey, M.C.; Fernandez, E.; Hart, M.J.; Gelfond, J.; Bokov, A.F.; Rani, S.; Strong, R. Rapamycin improves motor function, reduces 4-hydroxynonenal adducted protein in brain, and attenuates synaptic injury in a mouse model of synucleinopathy. *Pathobiol. Aging Age Relat. Dis.* **2015**, *5*, 28743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Malagelada, C.; Jin, Z.H.; Jackson-Lewis, V.; Przedborski, S.; Greene, L.A. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 1166–1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Napolitano, G.; Ballabio, A. TFEB at a glance. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 2475–2481. [[CrossRef](#)]
146. Kilpatrick, K.; Zeng, Y.; Hancock, T.; Segatori, L. Genetic and chemical activation of TFEB mediates clearance of aggregated alpha-synuclein. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120819. [[CrossRef](#)]
147. Decressac, M.; Mattsson, B.; Weikop, P.; Lundblad, M.; Jakobsson, J.; Bjorklund, A. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from alpha-synuclein toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E1817–E1826. [[CrossRef](#)]
148. Tan, S.; Yu, C.Y.; Sim, Z.W.; Low, Z.S.; Lee, B.; See, F.; Min, N.; Gautam, A.; Chu, J.J.H.; Ng, K.W.; et al. Pomegranate activates TFEB to promote autophagy-lysosomal fitness and mitophagy. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 727. [[CrossRef](#)]
149. Kim, C.; Rockenstein, E.; Spencer, B.; Kim, H.K.; Adame, A.; Trejo, M.; Stafa, K.; Lee, H.J.; Lee, S.J.; Masliah, E. Antagonizing Neuronal Toll-like Receptor 2 Prevents Synucleinopathy by Activating Autophagy. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 771–782. [[CrossRef](#)]
150. Kim, C.; Ho, D.H.; Suk, J.E.; You, S.; Michael, S.; Kang, J.; Joong Lee, S.; Masliah, E.; Hwang, D.; Lee, H.J.; et al. Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1562. [[CrossRef](#)]
151. Rodríguez-Navarro, J.A.; Rodríguez, L.; Casarejos, M.J.; Solano, R.M.; Gómez, A.; Perucho, J.; Cuervo, A.M.; García de Yébenes, J.; Mena, M.A. Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *39*, 423–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Sarkar, S.; Davies, J.E.; Huang, Z.; Tunnacliffe, A.; Rubinsztein, D.C. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5641–5652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Luan, Y.; Ren, X.; Zheng, W.; Zeng, Z.; Guo, Y.; Hou, Z.; Guo, W.; Chen, X.; Li, F.; Chen, J.F. Chronic Caffeine Treatment Protects Against alpha-Synucleinopathy by Reestablishing Autophagy Activity in the Mouse Striatum. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Hou, L.; Xiong, N.; Liu, L.; Huang, J.; Han, C.; Zhang, G.; Li, J.; Xu, X.; Lin, Z.; Wang, T. Lithium protects dopaminergic cells from rotenone toxicity via autophagy enhancement. *BMC Neurosci.* **2015**, *16*, 82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Li, X.Z.; Chen, X.P.; Zhao, K.; Bai, L.M.; Zhang, H.; Zhou, X.P. Therapeutic effects of valproate combined with lithium carbonate on MPTP-induced parkinsonism in mice: Possible mediation through enhanced autophagy. *Int. J. Neurosci.* **2013**, *123*, 73–79. [[CrossRef](#)]
156. Williams, A.; Sarkar, S.; Cuddon, P.; Ttofi, E.K.; Saiki, S.; Siddiqi, F.H.; Jahreiss, L.; Fleming, A.; Pask, D.; Goldsmith, P.; et al. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 295–305. [[CrossRef](#)]
157. Pagan, F.; Hebron, M.; Valadez, E.H.; Torres-Yaghi, Y.; Huang, X.; Mills, R.R.; Wilmarth, B.M.; Howard, H.; Dunn, C.; Carlson, A.; et al. Nilotinib Effects in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *J. Parkinsons Dis.* **2016**, *6*, 503–517. [[CrossRef](#)]
158. Pagan, F.L.; Hebron, M.L.; Wilmarth, B.; Torres-Yaghi, Y.; Lawler, A.; Mundel, E.E.; Yusuf, N.; Starr, N.J.; Arellano, J.; Howard, H.H.; et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single dose Nilotinib in individuals with Parkinson's disease. *Pharm. Res. Perspect.* **2019**, *7*, e00470. [[CrossRef](#)]
159. Lee, J.-H.; McBrayer, M.K.; Wolfe, D.M.; Haslett, L.J.; Kumar, A.; Sato, Y.; Lie, P.P.Y.; Mohan, P.; Coffey, E.E.; Kompella, U.; et al. Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca(2+) Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated Lysosome Acidification. *Cell Rep.* **2015**, *12*, 1430–1444. [[CrossRef](#)]
160. Prévot, G.; Soria, F.N.; Thiolat, M.-L.; Daniel, J.; Verlhac, J.B.; Blanchard-Desce, M.; Bezard, E.; Barthélémy, P.; Crauste-Manciet, S.; Dehay, B. Harnessing Lysosomal pH through PLGA Nanoemulsion as a Treatment of Lysosomal-Related Neurodegenerative Diseases. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 4083–4089. [[CrossRef](#)]

161. Koh, J.-Y.; Kim, H.N.; Hwang, J.J.; Kim, Y.-H.; Park, S.E. Lysosomal dysfunction in proteinopathic neurodegenerative disorders: Possible therapeutic roles of cAMP and zinc. *Mol. Brain* **2019**, *12*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Ambrosi, G.; Ghezzi, C.; Zangaglia, R.; Levandis, G.; Pacchetti, C.; Blandini, F. Amboxol-induced rescue of defective glucocerebrosidase is associated with increased LIMP-2 and saposin C levels in GBA1 mutant Parkinson's disease cells. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *82*, 235–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. McNeill, A.; Magalhaes, J.; Shen, C.; Chau, K.Y.; Hughes, D.; Mehta, A.; Foltynie, T.; Cooper, J.M.; Abramov, A.Y.; Gegg, M.; et al. Amboxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain* **2014**, *137*, 1481–1495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Silveira, C.R.A.; MacKinley, J.; Coleman, K.; Li, Z.; Finger, E.; Bartha, R.; Morrow, S.A.; Wells, J.; Borrie, M.; Tirona, R.G.; et al. Amboxol as a novel disease-modifying treatment for Parkinson's disease dementia: Protocol for a single-centre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Neurol.* **2019**, *19*, 20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Lu, J.H.; Tan, J.Q.; Durairajan, S.S.; Liu, L.F.; Zhang, Z.H.; Ma, L.; Shen, H.M.; Chan, H.Y.; Li, M. Isorhynchophylline, a natural alkaloid, promotes the degradation of alpha-synuclein in neuronal cells via inducing autophagy. *Autophagy* **2012**, *8*, 98–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Wang, K.; Huang, J.; Xie, W.; Huang, L.; Zhong, C.; Chen, Z. Beclin1 and HMGB1 ameliorate the alpha-synuclein-mediated autophagy inhibition in PC12 cells. *Diagn. Pathol.* **2016**, *11*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Xilouri, M.; Brekk, O.R.; Landeck, N.; Pitychoutis, P.M.; Papisilekas, T.; Papadopoulou-Daifoti, Z.; Kirik, D.; Stefanis, L. Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates alpha-synuclein-induced neurodegeneration. *Brain* **2013**, *136*, 2130–2146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Anguiano, J.; Garner, T.P.; Mahalingam, M.; Das, B.C.; Gavathiotis, E.; Cuervo, A.M. Chemical modulation of chaperone-mediated autophagy by retinoic acid derivatives. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 374–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Mullett, S.J.; Di Maio, R.; Greenamyre, J.T.; Hinkle, D.A. DJ-1 expression modulates astrocyte-mediated protection against neuronal oxidative stress. *J. Mol. Neurosci.* **2013**, *49*, 507–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Mullett, S.J.; Hinkle, D.A. DJ-1 knock-down in astrocytes impairs astrocyte-mediated neuroprotection against rotenone. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *33*, 28–36. [[CrossRef](#)]
171. Mullett, S.J.; Hinkle, D.A. DJ-1 deficiency in astrocytes selectively enhances mitochondrial Complex I inhibitor-induced neurotoxicity. *J. Neurochem.* **2011**, *117*, 375–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. De Miranda, B.R.; Rocha, E.M.; Bai, Q.; El Ayadi, A.; Hinkle, D.; Burton, E.A.; Timothy Greenamyre, J. Astrocyte-specific DJ-1 overexpression protects against rotenone-induced neurotoxicity in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **2018**, *115*, 101–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Pupyshev, A.B.; Tikhonova, M.A.; Akopyan, A.A.; Tenditnik, M.V.; Dubrovina, N.I.; Korolenko, T.A. Therapeutic activation of autophagy by combined treatment with rapamycin and trehalose in a mouse MPTP-induced model of Parkinson's disease. *Pharm. Biochem. Behav.* **2019**, *177*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Références bibliographiques

- Aguib Y, Heiseke A, Gilch S, Riemer C, Baier M, Ertmer A, Schätzl HM (2009) Autophagy induction by trehalose counter-acts cellular prion-infection. *Autophagy* 5: 361-369
- Ahmed Z, Asi YT, Sailer A, Lees AJ, Houlden H, Revesz T, Holton JL (2012) The neuropathology, pathophysiology and genetics of multiple system atrophy. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38: 4-24
- Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, Schapira AH (2010) Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol* 67: 1464-72
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJ, Cooper JM (2011) Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis* 42: 360-7
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Rodriguez-Oroz MC, Obeso JA, Cooper JM (2013) Influence of microRNA deregulation on chaperone-mediated autophagy and alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. *Cell Death Dis* 4: e545
- Alves G, Müller B, Herlofson K, HogenEsch I, Telstad W, Aarsland D, Tysnes O-B, Larsen JP (2009) Incidence of Parkinson's disease in Norway: the Norwegian ParkWest study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 80: 851-857
- Ambrosi G, Ghezzi C, Zangaglia R, Levandis G, Pacchetti C, Blandini F (2015) Ambroxol-induced rescue of defective glucocerebrosidase is associated with increased LIMP-2 and saposin C levels in GBA1 mutant Parkinson's disease cells. *Neurobiology of Disease* 82: 235-242
- Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero M, Michel P, Marquez J, Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y (1997) *Apoptosis and Autophagy in Nigral Neurons of Patients with Parkinson's Disease*.
- Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J, Aasly JO, Rajput A, Rajput AH, Jon Stoessl A, Farrer MJ (2013) Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement Disorders* 28: 811-813
- Argüelles J-C (2014) Why Can't Vertebrates Synthesize Trehalose? *Journal of Molecular Evolution* 79: 111-116
- Aron Badin R, Vadori M, Cozzi E, Hantraye P (2015) Translational research for Parkinson's disease: The value of pre-clinical primate models. *European Journal of Pharmacology* 759: 118-126
- Arotçarena ML, Dehay B (2018) Les synucléinopathies sont-elles des maladies à prions ? *Pratique Neurologique FMC*
- Arotçarena ML, Teil M, Dehay B (2019) Autophagy in Synucleinopathy: The Overwhelmed and Defective Machinery. *Cells* 8
- Atashrazm F, Hammond D, Perera G, Dobson-Stone C, Mueller N, Pickford R, Kim WS, Kwok JB, Lewis SJG, Halliday GM, Dzamko N (2018) Reduced glucocerebrosidase activity in monocytes from patients with Parkinson's disease. *Scientific reports* 8: 15446-15446
- Bae EJ, Yang NY, Song M, Lee CS, Lee JS, Jung BC, Lee HJ, Kim S, Masliah E, Sardi SP, Lee SJ (2014) Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell transmission of alpha-synuclein. *Nat Commun* 5: 4755
- Bai X, Wey MC-Y, Fernandez E, Hart MJ, Gelfond J, Bokov AF, Rani S, Strong R (2015) Rapamycin improves motor function, reduces 4-hydroxynonenal adducted protein in brain, and attenuates synaptic injury in a mouse model of synucleinopathy. *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases* 5: 28743
- Balducci C, Pierguidi L, Persichetti E, Parnetti L, Sbaragli M, Tassi C, Orlacchio A, Calabresi P, Beccari T, Rossi A (2007) Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease. *Movement Disorders* 22: 1481-1484
- Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, Diep L, Fox M, Goldstein JM, Soriano F, Seubert P, Chilcote TJ (2008) Red Blood Cells Are the Major Source of Alpha-Synuclein in Blood. *Neurodegenerative Diseases* 5: 55-59
- Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ (2011) α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477: 107

- Bassil F, Guerin PA, Dutheil N, Li Q, Klugmann M, Meissner WG, Bezard E, Fernagut P-O (2017) Viral-mediated oligodendroglial alpha-synuclein expression models multiple system atrophy. *32*: 1230-1239
- Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG, Arizona Parkinson's Disease C (2010) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 119: 689-702
- Ben-Shlomo Y, Wenning GK, Tison F, Quinn NP (1997) Survival of patients with pathologically proven multiple system atrophy. *A meta-analysis* 48: 384-393
- Benazzouz A, Gross C, Féger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of Rigidity and Improvement in Motor Performance by Subthalamic High-frequency Stimulation in MPTP-treated Monkeys. *European Journal of Neuroscience* 5: 382-389
- Bennett MC, Bishop JF, Leng Y, Chock PB, Chase TN, Mouradian MM (1999) Degradation of α -Synuclein by Proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 274: 33855-33858
- Bieri G, Gitler AD, Brahic M (2017) Internalization, axonal transport and release of fibrillar forms of alpha-synuclein. *Neurobiol Dis*
- Binolfi A, Rasia RM, Bertoncini CW, Ceolin M, Zweckstetter M, Griesinger C, Jovin TM, Fernández CO (2006) Interaction of α -Synuclein with Divalent Metal Ions Reveals Key Differences: A Link between Structure, Binding Specificity and Fibrillation Enhancement. *Journal of the American Chemical Society* 128: 9893-9901
- Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961) [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wiener klinische Wochenschrift* 73: 787-8
- Bleasel JM, Halliday GM, Kim WS (2016) Animal modeling an oligodendroglialopathy--multiple system atrophy. *Acta neuropathologica communications* 4: 12-12
- Blesa J, Vila M (2019) Parkinson disease, substantia nigra vulnerability, and calbindin expression: Enlightening the darkness? *Movement Disorders* 34: 161-163
- Bohic S, Murphy K, Paulus W, Cloetens P, Salomé M, Susini J, Double K (2008) Intracellular Chemical Imaging of the Developmental Phases of Human Neuromelanin Using Synchrotron X-ray Microspectroscopy. *Analytical Chemistry* 80: 9557-9566
- Bonello F, Hassoun S-M, Mouton-Liger F, Shin YS, Muscat A, Tesson C, Lesage S, Beart PM, Brice A, Krupp J, Corvol J-C, Corti O (2019) LRRK2 impairs PINK1/Parkin-dependent mitophagy via its kinase activity: pathologic insights into Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics* 28: 1645-1660
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MCJ, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meo G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003) Mutations in the *DJ-1* Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science* 299: 256-259
- Bourdenx M, Daniel J, Genin E, Soria FN, Blanchard-Desce M, Bezard E, Dehay B (2016) Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implications for Parkinson and other lysosomal-related diseases. *Autophagy* 12: 472-483
- Bourdenx M, Dovero S, Engeln M, Bido S, Bastide MF, Dutheil N, Vollenweider I, Baud L, Piron C, Grouthier V, Boraud T, Porras G, Li Q, Baekelandt V, Scheller D, Michel A, Fernagut P-O, Georges F, Courtine G, Bezard E et al. (2015) Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by α -synuclein overexpression. *Acta neuropathologica communications* 3: 46-46
- Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, Madiona K, Olieric V, Böckmann A, Meier BH, Melki R (2013) Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nature communications* 4: 2575-2575
- Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA (1997) Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology* 49: 1284-1288
- Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 396: 67-72
- Braak H, Del Tredici K (2017) Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. *Journal of Parkinson's disease* 7: S71-S85

- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24: 197-211
- Braak H DTK, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. (2002) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* 24: 197-211
- Bradl M, Lassmann H (2010) Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119: 37-53
- Bronstein JM, Tagliati M, Alterman RL, Lozano AM, Volkmann J, Stefani A, Horak FB, Okun MS, Foote KD, Krack P, Pahwa R, Henderson JM, Hariz MI, Bakay RA, Rezai A, Marks WJ, Jr., Moro E, Vitek JL, Weaver FM, Gross RE et al. (2011) Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Archives of neurology* 68: 165-165
- Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR (2005) Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect* 113: 1250-6
- Burkhardt CR, Filley C, Kleinschmidt-DeMasters BK, de la Monte S, Norenberg MD, Schneck SA (1988) Diffuse Lewy body disease and progressive dementia. *Neurology* 38: 1520-1520
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329: 1663-1667
- Carballo-Carbajal I, Laguna A, Romero-Giménez J, Cuadros T, Bové J, Martínez-Vicente M, Parent A, Gonzalez-Sepulveda M, Peñuelas N, Torra A, Rodríguez-Galván B, Ballabio A, Hasegawa T, Bortolozzi A, Gelpi E, Vila M (2019) Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. *Nature communications* 10: 973-973
- Carlson SS, Kelly RB (1980) An antiserum specific for cholinergic synaptic vesicles from electric organ. *The Journal of cell biology* 87: 98-103
- Castillo K, Nassif M, Valenzuela V, Rojas F, Matus S, Mercado G, Court FA, van Zundert B, Hetz C (2013) Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. *Autophagy* 9: 1308-1320
- Cavaliere F, Cerf L, Dehay B, Ramos-Gonzalez P, De Giorgi F, Bourdenx M, Bessede A, Obeso JA, Matute C, Ichas F, Bezard E (2017) In vitro α -synuclein neurotoxicity and spreading among neurons and astrocytes using Lewy body extracts from Parkinson disease brains. *Neurobiology of Disease* 103: 101-112
- Charcot J-M (1872) De la paralyse agitante. *Oeuvres complètes - Leçons sur les maladie du système nerveux*
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AHV (2006) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *The Lancet Neurology* 5: 235-245
- Chen SG, Stribinskis V, Rane MJ, Demuth DR, Gozal E, Roberts AM, Jagadapillai R, Liu R, Choe K, Shivakumar B, Son F, Jin S, Kerber R, Adame A, Masliah E, Friedland RP (2016) Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans*. *Scientific reports* 6: 34477-34477
- Chiasserini D, Paciotti S, Eusebi P, Persichetti E, Tasegian A, Kurzawa-Akanbi M, Chinnery PF, Morris CM, Calabresi P, Parnetti L, Beccari T (2015) Selective loss of glucocerebrosidase activity in sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Mol Neurodegener* 10: 15
- Chiba Y, Takei S, Kawamura N, Kawaguchi Y, Sasaki K, Hasegawa-Ishii S, Furukawa A, Hosokawa M, Shimada A (2012) Immunohistochemical localization of aggresomal proteins in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38: 559-71
- Choi B-K, Choi M-G, Kim J-Y, Yang Y, Lai Y, Kweon D-H, Lee NK, Shin Y-K (2013) Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 4087-4092
- Choubey V, Safiulina D, Vaarmann A, Cagalinec M, Wareski P, Kuum M, Zharkovsky A, Kaasik A (2011) Mutant A53T alpha-synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *J Biol Chem* 286: 10814-24
- Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, Olanow CW, Kordower JH (2009) Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol Dis* 35: 385-98
- Cleeter MW, Chau KY, Gluck C, Mehta A, Hughes DA, Duchon M, Wood NW, Hardy J, Mark Cooper J, Schapira AH (2013) Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. *Neurochem Int* 62: 1-7
- Colby DW, Prusiner SB (2011) Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a006833

- Colla E, Coune P, Liu Y, Pletnikova O, Troncoso JC, Iwatsubo T, Schneider BL, Lee MK (2012) Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α -synucleinopathy in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32: 3306-3320
- Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet J-C, Bonini NM, Lindquist S (2006) Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science (New York, NY)* 313: 324-328
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism — Chronic Treatment with L-Dopa. *The New England Journal of Medicine* 280: 337-345
- Cremades N, Cohen SIA, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A, Sandal M, Clarke RW, Dunne P, Aprile FA, Bertocini CW, Wood NW, Knowles TPJ, Dobson CM, Klenerman D (2012) Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell* 149: 1048-1059
- Crews L, Spencer B, Desplats P, Patrick C, Paulino A, Rockenstein E, Hansen L, Adame A, Galasko D, Masliah E (2010a) Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PLoS One* 5: e9313
- Crews L, Spencer B, Desplats P, Patrick C, Paulino A, Rockenstein E, Hansen L, Adame A, Galasko D, Masliah E (2010b) Selective Molecular Alterations in the Autophagy Pathway in Patients with Lewy Body Disease and in Models of α -Synucleinopathy. *PLOS ONE* 5: e9313
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D (2004) Impaired Degradation of Mutant α -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* 305: 1292
- Cuervo AM, Wong E (2013) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research* 24: 92
- Cullen V, Sardi SP, Ng J, Xu YH, Sun Y, Tomlinson JJ, Kolodziej P, Kahn I, Saftig P, Woulfe J, Rochet JC, Glicksman MA, Cheng SH, Grabowski GA, Shihabuddin LS, Schlossmacher MG (2011) Acid beta-glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter alpha-synuclein processing. *Ann Neurol* 69: 940-53
- Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L, Vanderburg CR, McLean PJ (2012) Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Molecular Neurodegeneration* 7: 42
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39: 889-909
- de Lau LML, Breteler MMB (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 5: 525-535
- DeBosch BJ, Heitmeier MR, Mayer AL, Higgins CB, Crowley JR, Kraft TE, Chi M, Newberry EP, Chen Z, Finck BN, Davidson NO, Yarasheski KE, Hruz PW, Moley KH (2016) Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Science signaling* 9: ra21-ra21
- Decressac M, Mattsson B, Weikop P, Lundblad M, Jakobsson J, Bjorklund A (2013) TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from alpha-synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E1817-26
- Dehay B, Bourdenx M, Gorry P, Przedborski S, Vila M, Hunot S, Singleton A, Olanow CW, Merchant KM, Bezard E, Petsko GA, Meissner WG (2015) Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *The Lancet Neurology* 14: 855-866
- Dehay B, Bove J, Rodriguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, Vila M (2010) Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci* 30: 12535-44
- Dehay B, Ramirez A, Martinez-Vicente M, Perier C, Cannon MH, Doudnikoff E, Vital A, Vila M, Klein C, Bezard E (2012) Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9611-6
- Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee SJ (2009) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13010-5
- Djelloul M, Holmqvist S, Boza-Serrano A, Azevedo C, Yeung MS, Goldwurm S, Frisén J, Deierborg T, Roybon L (2015) Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Lineage: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models. *Stem cell reports* 5: 174-184

- Dorsey ER, Elbaz A, Nichols E, Abd-Allah F, Abdelalim A, Adsuar JC, Ansha MG, Brayne C, Choi J-YJ, Collado-Mateo D, Dahodwala N, Do HP, Edessa D, Endres M, Fereshtehnejad S-M, Foreman KJ, Gankpe FG, Gupta R, Hankey GJ, Hay SI et al. (2018) Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology* 17: 939-953
- Du J, Liang Y, Xu F, Sun B, Wang Z (2013) Trehalose rescues Alzheimer's disease phenotypes in APP/PS1 transgenic mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65: 1753-1756
- Edvardson S, Cinnamon Y, Ta-Shma A, Shaag A, Yim YI, Zenvirt S, Jalas C, Lesage S, Brice A, Taraboulos A, Kaestner KH, Greene LE, Elpeleg O (2012) A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One* 7: e36458
- Edwards LL, Quigley EM, Pfeiffer RF (1992) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology* 42: 726-32
- El-Agnaf OMA, Jakes R, Curran MD, Middleton D, Ingenito R, Bianchi E, Pessi A, Neill D, Wallace A (1998) Aggregates from mutant and wild-type α -synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of β -sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Letters* 440: 71-75
- Eslamboli A, Romero-Ramos M, Burger C, Bjorklund T, Muzyczka N, Mandel RJ, Baker H, Ridley RM, Kirik D (2007) Long-term consequences of human alpha-synuclein overexpression in the primate ventral midbrain. *Brain* 130: 799-815
- Ferretta A, Gaballo A, Tanzarella P, Piccoli C, Capitanio N, Nico B, Annese T, Di Paola M, Dell'Aquila C, De Mari M, Ferranini E, Bonifati V, Pacelli C, Cocco T (2014) Effect of resveratrol on mitochondrial function: Implications in parkin-associated familial Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842: 902-915
- Finberg JP, Tenne M, Youdim MB (1981) Tyramine antagonistic properties of AGN 1135, an irreversible inhibitor of monoamine oxidase type B. *British journal of pharmacology* 73: 65-74
- Finch CE, Austad SN (2012) Primate aging in the mammalian scheme: the puzzle of extreme variation in brain aging. *Age (Dordrecht, Netherlands)* 34: 1075-1091
- Foehring RC, Zhang XF, Lee JCF, Callaway JC (2009) Endogenous calcium buffering capacity of substantia nigral dopamine neurons. *Journal of neurophysiology* 102: 2326-2333
- Freeman D, Cedillos R, Choyke S, Lukic Z, McGuire K, Marvin S, Burrage AM, Sudholt S, Rana A, O'Connor C, Wiethoff CM, Campbell EM (2013) Alpha-synuclein induces lysosomal rupture and cathepsin dependent reactive oxygen species following endocytosis. *PloS one* 8: e62143-e62143
- Friedman A, Galazka-Friedman J, Bauminger ER (2007) Iron as a trigger of neurodegeneration in Parkinson's disease. In *Handbook of Clinical Neurology*, pp 493-505. Elsevier
- Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science (New York, NY)* 334: 358-362
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002) α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology* 4: 160-164
- Fullard ME, Morley JF, Duda JE (2017) Olfactory Dysfunction as an Early Biomarker in Parkinson's Disease. *Neuroscience bulletin* 33: 515-525
- Fusco G, Chen SW, Williamson PTF, Cascella R, Perni M, Jarvis JA, Cecchi C, Vendruscolo M, Chiti F, Cremades N, Ying L, Dobson CM, De Simone A (2017) Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science* 358: 1440-1443
- Gan-Or Z, Dion PA, Rouleau GA (2015) Genetic perspective on the role of the autophagy-lysosome pathway in Parkinson disease. *Autophagy* 11: 1443-1457
- García-Sanz P, Orgaz L, Fuentes JM, Vicario C, Moratalla R (2018) Cholesterol and multilamellar bodies: Lysosomal dysfunction in GBA-Parkinson disease. *Autophagy* 14: 717-718
- Gegg ME, Burke D, Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, Schapira AH (2012) Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann Neurol* 72: 455-63
- Geng X, Lou H, Wang J, Li L, Swanson AL, Sun M, Beers-Stolz D, Watkins S, Perez RG, Drain P (2011) α -Synuclein binds the K(ATP) channel at insulin-secretory granules and inhibits insulin secretion. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 300: E276-E286
- Ghosh D, Sahay S, Ranjan P, Salot S, Mohite GM, Singh PK, Dwivedi S, Carvalho E, Banerjee R, Kumar A, Maji SK (2014) The Newly Discovered Parkinson's Disease Associated Finnish Mutation

- (A53E) Attenuates α -Synuclein Aggregation and Membrane Binding. *Biochemistry* 53: 6419-6421
- Giasson BI, Duda JE, Murray IVJ, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective α -Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions. *Science* 290: 985-989
- Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276: 2380-6
- Giguère N, Burke Nanni S, Trudeau L-E (2018) On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson's Disease. *Frontiers in neurology* 9: 455-455
- Gilman S, Wenning GK, Low PA, Brooks DJ, Mathias CJ, Trojanowski JQ, Wood NW, Colosimo C, Dürr A, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lees A, Poewe W, Quinn N, Revesz T, Robertson D, Sandroni P, Seppi K, Vidailhet M (2008) Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 71: 670-676
- Goetz CG (2011) The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1: a008862
- Gonzalez-Horta A, Hernandez BG, Chavez-Montes A (2013) Fluorescence as a Tool to Study Lipid-Protein Interactions: The Case of α -Synuclein. *Open Journal of Biophysics* 03: 112-119
- Gould N, Mor DE, Lightfoot R, Malkus K, Giasson B, Ischiropoulos H (2014) Evidence of native α -synuclein conformers in the human brain. *The Journal of biological chemistry* 289: 7929-7934
- Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ (2003) Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 4078-4083
- Greenfield JG, Bosanquet FD (1953) The brain-stem lesions in Parkinsonism. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 16: 213-226
- Guardia-Laguarta C, Area-Gomez E, Rüb C, Liu Y, Magrané J, Becker D, Voos W, Schon EA, Przedborski S (2014) α -Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 249-259
- Gündner AL, Duran-Pacheco G, Zimmermann S, Ruf I, Moors T, Baumann K, Jagasia R, van de Berg WDJ, Kremer T (2019) Path mediation analysis reveals GBA impacts Lewy body disease status by increasing α -synuclein levels. *Neurobiology of Disease* 121: 205-213
- Gustavsson EK, Trinh J, Guella I, Vilarino-Guell C, Appel-Cresswell S, Stoessl AJ, Tsui JK, McKeown M, Rajput A, Rajput AH, Aasly JO, Farrer MJ (2015) DNAJC13 genetic variants in parkinsonism. *Mov Disord* 30: 273-8
- Guzman JN, Sánchez-Padilla J, Chan CS, Surmeier DJ (2009) Robust pacemaking in substantia nigra dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 11011-11019
- Halliday G, McCann H, Shepherd C (2012) Evaluation of the Braak hypothesis: how far can it explain the pathogenesis of Parkinson's disease? *Expert Review of Neurotherapeutics* 12: 673-686
- Halliday GM, Holton JL, Revesz T, Dickson DW (2011) Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies. *Acta Neuropathologica* 122: 187-204
- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495: 389
- Hara K, Momose Y, Tokiguchi S, Shimohata M, Terajima K, Onodera O, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Hirasawa M, Mizuno Y, Ogata K, Goto J, Kanazawa I, Nishizawa M, Tsuji S (2007) Multiplex Families With Multiple System Atrophy. *JAMA Neurology* 64: 545-551
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441: 885-889
- Harding JD (2017) Nonhuman Primates and Translational Research: Progress, Opportunities, and Challenges. *ILAR Journal* 58: 141-150
- Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, Okuno T, Asahara T, Nomoto K, Shibata A, Fujisawa Y, Minato T, Okamoto A, Ohno K, Hirayama M (2015) Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease. *PLOS ONE* 10: e0142164

- Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Yamamura Y, Yoshino H, Kobayashi T, Yokochi M, Wang M, Yoritaka A, Kondo T, Kuzuhara S, Nakamura S, Shimizu N, Mizuno Y (1998) Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: Evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Annals of Neurology* 44: 935-941
- Hattori N, Matsumine H, Asakawa S, Kitada T, Yoshino H, Elibol B, Brookes AJ, Yamamura Y, Kobayashi T, Wang M, Yoritaka A, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y (1998) Point Mutations (Thr240Arg and Ala311Stop) in the Parkin Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249: 754-758
- He Q, Koprach JB, Wang Y, Yu W-b, Xiao B-g, Brotchie JM, Wang J (2016) Treatment with Trehalose Prevents Behavioral and Neurochemical Deficits Produced in an AAV α -Synuclein Rat Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology* 53: 2258-2268
- Herculano-Houzel S (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. 3
- Higashi S, Moore DJ, Minegishi M, Kasanuki K, Fujishiro H, Kabuta T, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Hino H, Kosaka K, Sato K, Arai H, Wada K, Iseki E (2011) Localization of MAP1-LC3 in Vulnerable Neurons and Lewy Bodies in Brains of Patients With Dementia With Lewy Bodies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 70: 264-280
- Hirsch EC (1992) Why are nigral catecholaminergic neurons more vulnerable than other cells in Parkinson's disease? *Ann Neurol* 32: S88-S93
- Hoffmann AC, Minakaki G, Menges S, Salvi R, Savitskiy S, Kazman A, Vicente Miranda H, Mielenz D, Klucken J, Winkler J, Xiang W (2019) Extracellular aggregated alpha synuclein primarily triggers lysosomal dysfunction in neural cells prevented by trehalose. *Sci Rep* 9: 544
- Hohler AD, Singh VJ (2012) Probable hereditary multiple system atrophy (MSA-A) in a family in the United States. *Journal of Clinical Neuroscience* 19: 479-480
- Holler CJ, Taylor G, McEachin ZT, Deng Q, Watkins WJ, Hudson K, Easley CA, Hu WT, Hales CM, Rossoll W, Bassell GJ, Kukar T (2016) Trehalose upregulates progranulin expression in human and mouse models of GRN haploinsufficiency: a novel therapeutic lead to treat frontotemporal dementia. *Molecular neurodegeneration* 11: 46-46
- Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Bjorklund T, Wang ZY, Roybon L, Melki R, Li JY (2014) Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol* 128: 805-20
- Hoozemans JJM, van Haastert ES, Eikelenboom P, de Vos RAI, Rozemuller JM, Scheper W (2007) Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354: 707-711
- Hou L, Xiong N, Liu L, Huang J, Han C, Zhang G, Li J, Xu X, Lin Z, Wang T (2015) Lithium protects dopaminergic cells from rotenone toxicity via autophagy enhancement. *BMC neuroscience* 16: 82-82
- Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E (2008) Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat* 29: 567-83
- Ibáñez P, Lesage S, Janin S, Lohmann E, Durif F, Destée A, Bonnet A-M, Brefel-Courbon C, Heath S, Zelenika D, Agid Y, Dürr A, Brice A, Group FPsDGS (2009) α -Synuclein Gene Rearrangements in Dominantly Inherited Parkinsonism: Frequency, Phenotype, and Mechanisms. *JAMA Neurology* 66: 102-108
- Inoue K-i, Miyachi S, Nishi K, Okado H, Nagai Y, Minamimoto T, Nambu A, Takada M (2019) Recruitment of calbindin into nigral dopamine neurons protects against MPTP-Induced parkinsonism. *Movement Disorders* 34: 200-209
- Irwin DJ, Abrams JY, Schonberger LB, Leschek EW, Mills JL, Lee VM, Trojanowski JQ (2013) Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone. *JAMA Neurol* 70: 462-8
- Ishizawa K, Komori T, Arai N, Mizutani T, Hirose T (2008) Glial cytoplasmic inclusions and tissue injury in multiple system atrophy: A quantitative study in white matter (olivopontocerebellar system) and gray matter (nigrostriatal system). *Neuropathology* 28: 249-257
- Itoh K, Kasai T, Tsuji Y, Saito K, Mizuta I, Harada Y, Sudoh S, Mizuno T, Nakagawa M, Fushiki S (2014) Definite familial multiple system atrophy with unknown genetics. *Neuropathology* 34: 309-313

- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, Rohan de Silva HA, Kittel A, Saitoh T (1995) *The precursor protein of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system.*
- Iwasawa R, Mahul-Mellier A-L, Datler C, Pazarentzos E, Grimm S (2011) Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *The EMBO journal* 30: 556-568
- Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen E-L (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science* 117: 4837-4848
- Jakes R, Spillantini MG, Goedert M (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Letters* 345: 27-32
- James Parkinson, Member of the Royal College of Surgeons (2002) An Essay on the Shaking Palsy. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 14: 223-236
- Jankovic J (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 368-76
- Jellinger KA (2008) A critical reappraisal of current staging of Lewy-related pathology in human brain. *Acta Neuropathol* 116: 1-16
- Jellinger KA (2018) Multiple System Atrophy: An Oligodendroglioneural Synucleinopathy1. *J Alzheimers Dis* 62: 1141-1179
- Jellinger KA, Seppi K, Wenning GK (2005) Grading of neuropathology in multiple system atrophy: Proposal for a novel scale. *Movement Disorders* 20: S29-S36
- Jennings CG, Landman R, Zhou Y, Sharma J, Hyman J, Movshon JA, Qiu Z, Roberts AC, Roe AW, Wang X, Zhou H, Wang L, Zhang F, Desimone R, Feng G (2016) Opportunities and challenges in modeling human brain disorders in transgenic primates. *Nature Neuroscience* 19: 1123
- Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Yang Y, Anantharam V, Kanthasamy AG (2011) α -Synuclein negatively regulates protein kinase C δ expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 2035-2051
- Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RKB (2008) The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of α -synuclein staging. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34: 284-295
- Kalir A, Sabbagh A, Youdim MB (1981) Selective acetylenic 'suicide' and reversible inhibitors of monoamine oxidase types A and B. *British journal of pharmacology* 73: 55-64
- Kane JPM, Surendranathan A, Bentley A, Barker SAH, Taylor JP, Thomas AJ, Allan LM, McNally RJ, James PW, McKeith IG, Burn DJ, O'Brien JT (2018) Clinical prevalence of Lewy body dementia. *Alzheimers Res Ther* 10: 19
- Katsuse O, Iseki E, Marui W, Kosaka K (2003) Developmental stages of cortical Lewy bodies and their relation to axonal transport blockage in brains of patients with dementia with Lewy bodies. *Journal of the Neurological Sciences* 211: 29-35
- Kellie JF, Higgs RE, Ryder JW, Major A, Beach TG, Adler CH, Merchant K, Knierman MD (2014) Quantitative measurement of intact alpha-synuclein proteoforms from post-mortem control and Parkinson's disease brain tissue by intact protein mass spectrometry. *Scientific reports* 4: 5797-5797
- Killinger BA, Madaj Z, Sikora JW, Rey N, Haas AJ, Vepa Y, Lindqvist D, Chen H, Thomas PM, Brundin P, Brundin L, Labrie V (2018) The vermiform appendix impacts the risk of developing Parkinson's disease. *Science Translational Medicine* 10: eaar5280
- Kilpatrick K, Zeng Y, Hancock T, Segatori L (2015) Genetic and chemical activation of TFEB mediates clearance of aggregated alpha-synuclein. *PLoS One* 10: e0120819
- Kim MJ, Jeon S, Burbulla LF, Krainc D (2018) Acid ceramidase inhibition ameliorates α -synuclein accumulation upon loss of GBA1 function. *Human Molecular Genetics* 27: 1972-1988
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-608
- Klingelhofer L, Reichmann H (2017) Parkinson's disease as a multisystem disorder. *Journal of Neural Transmission* 124: 709-713
- Klionsky DJ, Schulman BA (2014) Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* 21: 336

- Klucken J, Poehler AM, Ebrahimi-Fakhari D, Schneider J, Nuber S, Rockenstein E, Schlotzer-Schrehardt U, Hyman BT, McLean PJ, Masliah E, Winkler J (2012) Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A 1-sensitive autophagy pathway. *Autophagy* 8: 754-66
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J-i, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441: 880-884
- Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL, Iwata J-i, Kominami E, Chait BT, Tanaka K, Yue Z (2007) Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 14489-14494
- Kong SM, Chan BK, Park JS, Hill KJ, Aitken JB, Cottle L, Farghaian H, Cole AR, Lay PA, Sue CM, Cooper AA (2014) Parkinson's disease-linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes alpha-Synuclein externalization via exosomes. *Hum Mol Genet* 23: 2816-33
- Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW (2008) Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14: 504-6
- Kordower JH, Dodiya HB, Kordower AM, Terpstra B, Paumier K, Madhavan L, Sortwell C, Steece-Collier K, Collier TJ (2011) Transfer of host-derived alpha synuclein to grafted dopaminergic neurons in rat. *Neurobiol Dis* 43: 552-7
- Kosaka K (1978) Lewy bodies in cerebral cortex. Report of three cases. *Acta Neuropathologica* 42: 127-134
- Kosaka K, Oyanagi S, Matsushita M, Hori A, Iwase S (1976) Presenile dementia with Alzheimer-, Pick- and Lewy-body changes. *Acta Neuropathologica* 36: 221-233
- Kostka M, Högen T, Danzer KM, Levin J, Habeck M, Wirth A, Wagner R, Glabe CG, Finger S, Heinzemann U, Garidel P, Duan W, Ross CA, Kretschmar H, Giese A (2008) Single Particle Characterization of Iron-induced Pore-forming α -Synuclein Oligomers. *Journal of Biological Chemistry* 283: 10992-11003
- Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC, Ferrante RJ (2000) MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *NeuroReport* 11: 211-213
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schols L, Riess O (1998) AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics* 18: 106-108
- Kumar S, Hedges SB (1998) A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* 392: 917-920
- Kuzdas-Wood D, Stefanova N, Jellinger KA, Seppi K, Schlossmacher MG, Poewe W, Wenning GK (2014) Towards translational therapies for multiple system atrophy. *Progress in neurobiology* 118: 19-35
- Laguna A, Schintu N, Nobre A, Alvarsson A, Volakakis N, Jacobsen JK, Gomez-Galan M, Sopova E, Joodmardi E, Yoshitake T, Deng Q, Kehr J, Ericson J, Svenningsson P, Shupliakov O, Perlmann T (2015) Dopaminergic control of autophagic-lysosomal function implicates Lmx1b in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 18: 826-35
- Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E (2013) The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature reviews Neuroscience* 14: 38-48
- Lázaro DF, Dias MC, Carija A, Navarro S, Madaleno CS, Tenreiro S, Ventura S, Outeiro TF (2016) The effects of the novel A53E alpha-synuclein mutation on its oligomerization and aggregation. *Acta Neuropathologica Communications* 4: 128
- Lázaro DF, Rodrigues EF, Langohr R, Shahpasandzadeh H, Ribeiro T, Guerreiro P, Gerhardt E, Kröhnert K, Klucken J, Pereira MD, Popova B, Kruse N, Mollenhauer B, Rizzoli SO, Braus GH, Danzer KM, Outeiro TF (2014) Systematic Comparison of the Effects of Alpha-synuclein Mutations on Its Oligomerization and Aggregation. *PLOS Genetics* 10: e1004741
- Lee H-J, Khoshaghideh F, Patel S, Lee S-J (2004) Clearance of α -Synuclein Oligomeric Intermediates via the Lysosomal Degradation Pathway. *The Journal of Neuroscience* 24: 1888
- Lee H-J, Suk J-E, Patrick C, Bae E-J, Cho J-H, Rho S, Hwang D, Masliah E, Lee S-J (2010) Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *The Journal of biological chemistry* 285: 9262-9272
- Lee H-J, Yoon Y-S, Lee S-J (2018) Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. *Cell death & disease* 9: 712-712

- Lee HJ, Cho ED, Lee KW, Kim JH, Cho SG, Lee SJ (2013) Autophagic failure promotes the exocytosis and intercellular transfer of alpha-synuclein. *Exp Mol Med* 45: e22
- Lee J-H, McBrayer MK, Wolfe DM, Haslett LJ, Kumar A, Sato Y, Lie PPY, Mohan P, Coffey EE, Kompella U, Mitchell CH, Lloyd-Evans E, Nixon RA (2015) Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca(2+) Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated Lysosome Acidification. *Cell reports* 12: 1430-1444
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. *The Lancet* 373: 2055-2066
- Lei Z, Cao G, Wei G (2019) A30P mutant α -synuclein impairs autophagic flux by inactivating JNK signaling to enhance ZKSCAN3 activity in midbrain dopaminergic neurons. *Cell Death & Disease* 10: 133
- Leroy E, Anastasopoulos D, Konitsiotis S, Lavedan C, Polymeropoulos MH (1998) Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Human Genetics* 103: 424-427
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honoré A, Rozas N, Pieri L, Madióna K, Dürr A, Melki R, Verny C, Brice A, Group fFPsDGS (2013) G51D α -synuclein mutation causes a novel Parkinsonian-pyramidal syndrome. *Annals of Neurology* 73: 459-471
- Lesage S, Dürr A, Tazir M, Lohmann E, Leutenegger A-L, Janin S, Pollak P, Brice A (2006) LRRK2 G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in North African Arabs. *New England Journal of Medicine* 354: 422-423
- Lewy F (1912) Paralysis agitans. I. *Pathologische anatomie Handbuch der neurologie*
- Li G, Yang H, Zhu D, Huang H, Liu G, Lun P (2014) Targeted suppression of chaperone-mediated autophagy by miR-320a promotes alpha-synuclein aggregation. *Int J Mol Sci* 15: 15845-57
- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehncrona S, Bjorklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14: 501-3
- Li W-w, Li J, Bao J-k (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 1125-1136
- Li X-z, Chen X-p, Zhao K, Bai L-m, Zhang H, Zhou X-p (2012) Therapeutic Effects of Valproate Combined With Lithium Carbonate on MPTP-Induced Parkinsonism in Mice: Possible Mediation Through Enhanced Autophagy. *International Journal of Neuroscience* 123: 73-79
- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid A-L (1998) Electrical Stimulation of the Subthalamic Nucleus in Advanced Parkinson's Disease. *The New England Journal of Medicine* 339: 1105-1111
- Lionnet A, Leclair-Visonneau L, Neunlist M, Murayama S, Takao M, Adler CH, Derkinderen P, Beach TG (2018) Does Parkinson's disease start in the gut? *Acta Neuropathol* 135: 1-12
- Liou J, Fivaz M, Inoue T, Meyer T (2007) Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 9301-9306
- Liu BF, F.; Pedersen, N.L.; Tillander, A.; Ludvigsson, J.F.; Ekbom, A.; Svenningsson, P.; Chen, H.; Wirdefeldt, K. (2017) Vagotomy and Parkinson disease A Swedish register-based matched-cohort study. *Neurology* 88: 1-7
- Lowe R, Pountney DL, Jensen PH, Gai WP, Voelcker NH (2004) Calcium(II) selectively induces alpha-synuclein annular oligomers via interaction with the C-terminal domain. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13: 3245-3252
- Lücking CB, Abbas N, Dürr A, Bonifati V, Bonnet AM, de Broucker T, De Michele G, Wood NW, Agid Y, Brice A (1998) Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *The Lancet* 352: 1355-1356
- Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM (2012) Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338: 949-53
- Mak SK, McCormack AL, Manning-Bog AB, Cuervo AM, Di Monte DA (2010) Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J Biol Chem* 285: 13621-9
- Makioka K, Yamazaki T, Fujita Y, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K (2010) Involvement of endoplasmic reticulum stress defined by activated unfolded protein response in multiple system atrophy. *Journal of the Neurological Sciences* 297: 60-65

- Makioka K, Yamazaki T, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K (2012) Activation and alteration of lysosomes in multiple system atrophy. *Neuroreport* 23: 270-6
- Malagelada C, Jin ZH, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Greene LA (2010) Rapamycin Protects against Neuron Death in *In Vitro* and *In Vivo* Models of Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience* 30: 1166-1175
- Mandel RJ, Marmion DJ, Kirik D, Chu Y, Heindel C, McCown T, Gray SJ, Kordower JH (2017) Novel oligodendroglial alpha synuclein viral vector models of multiple system atrophy: studies in rodents and nonhuman primates. *Acta neuropathologica communications* 5: 47-47
- Manfredsson FP, Luk KC, Benskey MJ, Gezer A, Garcia J, Kuhn NC, Sandoval IM, Patterson JR, O'Mara A, Yonkers R, Kordower JH (2018) Induction of alpha-synuclein pathology in the enteric nervous system of the rat and non-human primate results in gastrointestinal dysmotility and transient CNS pathology. *Neurobiol Dis* 112: 106-118
- Maroteaux L, Campanelli J, Scheller R (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of Neuroscience* 8: 2804-2815
- Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, Mercimek-Mahmutoglu S, Ebrahimi-Fakhari D, Warner TT, Durr A, Assmann B, Lohmann K, Kostic V, Klein C (2016) Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Movement Disorders* 31: 436-457
- Mars RB, Verhagen L (2013) Book review: Foraging with a prefrontal cortex makes all the difference. *Frontiers in Human Neuroscience* 7: 164
- Martin I, Kim JW, Dawson VL, Dawson TM (2014) LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 131: 554-565
- Martinez-Vicente M, Tallozy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov EV, Hodara R, Fredenburg R, Wu DC, Follenzi A, Dauer W, Przedborski S, Ischiropoulos H, Lansbury PT, Sulzer D, Cuervo AM (2008) Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* 118: 777-88
- Martinez J, Moeller I, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Luring B (2003) Parkinson's Disease-associated α -Synuclein Is a Calmodulin Substrate. *Journal of Biological Chemistry* 278: 17379-17387
- Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 136: 1128-38
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T (2009) Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *The Journal of Neuroscience* 29: 444-453
- Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, Yokochi M, Kobayashi T, Igarashi S, Takano H, Sanpei K, Koike R, Mori H, Kondo T, Mizutani Y, Schäffer AA, Yamamura Y, Nakamura S, Kuzuhara S, Tsuji S et al. (1997) Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *American journal of human genetics* 60: 588-596
- Matsuo A, Akiyoshi I, Lee GC, McGeer EG, McGeer PL, Kimura J (1998) Myelin degeneration in multiple system atrophy detected by unique antibodies. *The American journal of pathology* 153: 735-744
- Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, Sidransky E, Grabowski GA, Krainc D (2011) Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 146: 37-52
- Mazzulli JR, Zunke F, Isacson O, Studer L, Krainc D (2016) alpha-Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 1931-6
- McCann H, Stevens CH, Cartwright H, Halliday GM (2014) α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism & Related Disorders* 20: S62-S67
- McGlinchey RP, Lacy SM, Huffer KE, Tayebi N, Sidransky E, Lee JC (2019) C-terminal α -synuclein truncations are linked to cysteine cathepsin activity in Parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry*
- McGlinchey RP, Lee JC (2015) Cysteine cathepsins are essential in lysosomal degradation of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 9322-9327
- McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor J-P, Weintraub D, Aarsland D, Galvin J, Attems J, Ballard CG, Bayston A, Beach TG, Blanc F, Bohnen N, Bonanni L, Bras J, Brundin P, Burn D,

- Chen-Plotkin A, Duda JE et al. (2017) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology* 89: 88-100
- McNeill A, Magalhaes J, Shen C, Chau K-Y, Hughes D, Mehta A, Foltynie T, Cooper JM, Abramov AY, Gegg M, Schapira AHV (2014) Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain* 137: 1481-1495
- Mendez I, Viñuela A, Astradsson A, Mukhida K, Hallett P, Robertson H, Tierney T, Holness R, Dagher A, Trojanowski JQ, Isacson O (2008) Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nature Medicine* 14: 507-509
- Minakaki G, Menges S, Kittel A, Emmanouilidou E, Schaeffner I, Barkovits K, Bergmann A, Rockenstein E, Adame A, Marxreiter F, Mollenhauer B, Galasko D, Buzas EI, Schlotzer-Schrehardt U, Marcus K, Xiang W, Lie DC, Vekrellis K, Masliah E, Winkler J et al. (2018) Autophagy inhibition promotes SNCA/alpha-synuclein release and transfer via extracellular vesicles with a hybrid autophagosome-exosome-like phenotype. *Autophagy* 14: 98-119
- Mitsui J, Matsukawa T, Sasaki H, Yabe I, Matsushima M, Dürr A, Brice A, Takashima H, Kikuchi A, Aoki M, Ishiura H, Yasuda T, Date H, Ahsan B, Iwata A, Goto J, Ichikawa Y, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y et al. (2015) Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. *Annals of clinical and translational neurology* 2: 417-426
- Monzio Compagnoni G, Kleiner G, Samarani M, Aureli M, Faustini G, Bellucci A, Ronchi D, Bordoni A, Garbellini M, Salani S, Fortunato F, Frattini E, Abati E, Bergamini C, Fato R, Tabano S, Miozzo M, Serratto G, Passafaro M, Deleidi M et al. (2018) Mitochondrial Dysregulation and Impaired Autophagy in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons of Multiple System Atrophy. *Stem Cell Reports* 11: 1185-1198
- Moors T, Paciotti S, Chiasserini D, Calabresi P, Parnetti L, Beccari T, van de Berg WDJ (2016) Lysosomal Dysfunction and α -Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease: Diagnostic Links. *Movement Disorders* 31: 791-801
- Moors TE, Hoozemans JJM, Ingrassia A, Beccari T, Parnetti L, Chartier-Harlin M-C, van de Berg WDJ (2017) Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration* 12: 11
- Moors TE, Paciotti S, Ingrassia A, Quadri M, Breedveld G, Tasegian A, Chiasserini D, Eusebi P, Duran-Pacheco G, Kremer T, Calabresi P, Bonifati V, Parnetti L, Beccari T, van de Berg WDJ (2019) Characterization of Brain Lysosomal Activities in GBA-Related and Sporadic Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *Molecular neurobiology* 56: 1344-1355
- Mougenot A, S. N, A. B, E. M, J. V, L. L, S. L, T. B (2012) Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Aging* 33: 2225-8
- Murley A, Lackner LL, Osman C, West M, Voeltz GK, Walter P, Nunnari J (2013) ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *eLife* 2: e00422-e00422
- Murphy KE, Cottle L, Gysbers AM, Cooper AA, Halliday GM (2013) ATP13A2 (PARK9) protein levels are reduced in brain tissue of cases with Lewy bodies. *Acta neuropathologica communications* 1: 11-11
- Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Spiro AS, Furuta A, Cooper A, Garner B, Kabuta T, Halliday GM (2015) Lysosomal-associated membrane protein 2 isoforms are differentially affected in early Parkinson's disease. *Mov Disord* 30: 1639-47
- Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E, Cooper A, Garner B, Halliday GM (2014) Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain* 137: 834-48
- Namba T, Tian F, Chu K, Hwang S-Y, Yoon KW, Byun S, Hiraki M, Mandinova A, Lee SW (2013) CDIP1-BAP31 complex transduces apoptotic signals from endoplasmic reticulum to mitochondria under endoplasmic reticulum stress. *Cell reports* 5: 331-339
- Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, Li A, Holton J, Guerreiro R, Paudel R, Segarane B, Singleton A, Lees A, Hardy J, Houlden H, Revesz T, Wood NW (2009) Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain* 132: 1783-94
- Nielsen MS, Vorum H, Lindersson E, Jensen PH (2001) Ca²⁺ Binding to α -Synuclein Regulates Ligand Binding and Oligomerization. *Journal of Biological Chemistry* 276: 22680-22684

- Norris EH, Giasson BI, Hodara R, Xu S, Trojanowski JQ, Ischiropoulos H, Lee VM-Y (2005) Reversible Inhibition of α -Synuclein Fibrillization by Dopaminochrome-mediated Conformational Alterations. *Journal of Biological Chemistry* 280: 21212-21219
- Okazaki H, Lipkin LE, Aronson SM (1961) Diffuse Intracytoplasmic Ganglionic Inclusions (Lewy Type) Associated with Progressive Dementia and Quadriparesis in Flexion*†. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 20: 237-244
- Osterberg VR, Spinelli KJ, Weston LJ, Luk KC, Woltjer RL, Unni VK (2015) Progressive aggregation of alpha-synuclein and selective degeneration of lewy inclusion-bearing neurons in a mouse model of parkinsonism. *Cell reports* 10: 1252-1260
- Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B (1999) α -Synuclein Shares Physical and Functional Homology with 14-3-3 Proteins. *The Journal of Neuroscience* 19: 5782-5791
- Ota K, Obayashi M, Ozaki K, Ichinose S, Kakita A, Tada M, Takahashi H, Ando N, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K (2014) Relocation of p25 α /tubulin polymerization promoting protein from the nucleus to the perinuclear cytoplasm in the oligodendroglia of sporadic and COQ2 mutant multiple system atrophy. *Acta neuropathologica communications* 2: 136-136
- Pacelli C, Giguère N, Bourque M-J, Lévesque M, Slack Ruth S, Trudeau L-É (2015) Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current Biology* 25: 2349-2360
- Pagan F, Hebron M, Valadez EH, Torres-Yaghi Y, Huang X, Mills RR, Wilmarth BM, Howard H, Dunn C, Carlson A, Lawler A, Rogers SL, Falconer RA, Ahn J, Li Z, Moussa C (2016) Nilotinib Effects in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Journal of Parkinson's disease* 6: 503-517
- Pagan FL, Hebron ML, Wilmarth B, Torres-Yaghi Y, Lawler A, Mundel EE, Yusuf N, Starr NJ, Arellano J, Howard HH, Peyton M, Matar S, Liu X, Fowler AJ, Schwartz SL, Ahn J, Moussa C (2019) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single dose Nilotinib in individuals with Parkinson's disease. *Pharmacology Research & Perspectives* 7: e00470
- Pan T, Rawal P, Wu Y, Xie W, Jankovic J, Le W (2009) Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience* 164: 541-551
- Papagiannakis N, Xilouri M, Koros C, Simitsi AM, Stamelou M, Maniati M, Stefanis L (2019) Autophagy dysfunction in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 704: 112-115
- Papp MI, Kahn JE, Lantos PL (1989) Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *Journal of the Neurological Sciences* 94: 79-100
- Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim J-M, Chung J (2006) Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441: 1157-1161
- Park SM, Jung HY, Kim TD, Park JH, Yang C-H, Kim J (2002) Distinct Roles of the N-terminal-binding Domain and the C-terminal-solubilizing Domain of α -Synuclein, a Molecular Chaperone. *Journal of Biological Chemistry* 277: 28512-28520
- Parnetti L, Chiasserini D, Persichetti E, Eusebi P, Varghese S, Qureshi MM, Dardis A, Deganuto M, De Carlo C, Castrioto A, Balducci C, Paciotti S, Tambasco N, Bembi B, Bonanni L, Onofri M, Rossi A, Beccari T, El-Agnaf O, Calabresi P (2014) Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Mov Disord* 29: 1019-27
- Pasanen P, Myllykangas L, Siitonen M, Raunio A, Kaakkola S, Lyytinen J, Tienari PJ, Pöyhönen M, Paetau A (2014) A novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiology of Aging* 35: 2180.e1-2180.e5
- Pearce JM (1989) Aspects of the history of Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* Suppl: 6-10
- Peelaerts W, Bousset L, Baekelandt V, Melki RJC, Research T (2018) α -Synuclein strains and seeding in Parkinson's disease, incidental Lewy body disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy: similarities and differences. *Cell & Tissue Research* 373: 195-212
- Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, Van den Haute C, Melki R, Baekelandt V (2015) α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522: 340

- Peng C, Gathagan RJ, Covell DJ, Medellin C, Stieber A, Robinson JL, Zhang B, Pitkin RM, Olufemi MF, Luk KC, Trojanowski JQ, Lee VMY (2018) Cellular milieu imparts distinct pathological α -synuclein strains in α -synucleinopathies. *Nature* 557: 558-563
- Peng XM, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG (2005) α -Synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *Journal of Cell Science* 118: 3523-3530
- Pérez-Revuelta BI, Hettich MM, Ciociaro A, Rotermund C, Kahle PJ, Krauss S, Di Monte DA (2014) Metformin lowers Ser-129 phosphorylated α -synuclein levels via mTOR-dependent protein phosphatase 2A activation. *Cell death & disease* 5: e1209-e1209
- Perez-Villalba A, Sirerol-Piquer MS, Belenguer G, Soriano-Cantón R, Muñoz-Manchado AB, Villadiego J, Alarcón-Arís D, Soria FN, Dehay B, Bezard E, Vila M, Bortolozzi A, Toledo-Aral JJ, Pérez-Sánchez F, Fariñas I (2018) Synaptic Regulator α -Synuclein in Dopaminergic Fibers Is Essentially Required for the Maintenance of Subependymal Neural Stem Cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 38: 814-825
- Periquet M, Fulga T, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Feany MB (2007) Aggregated α -Synuclein Mediates Dopaminergic Neurotoxicity In Vivo. *The Journal of Neuroscience* 27: 3338-3346
- Philippart F, Destreel G, Merino-Sepúlveda P, Henny P, Engel D, Seutin V (2016) Differential Somatic Ca^{2+} Channel Profile in Midbrain Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* 36: 7234-7245
- Pieri L, Madiona K, Melki R (2016) Structural and functional properties of prefibrillar α -synuclein oligomers. *Scientific Reports* 6: 24526
- Poehler AM, Xiang W, Spitzer P, May VE, Meixner H, Rockenstein E, Chutna O, Outeiro TF, Winkler J, Masliah E, Klucken J (2014) Autophagy modulates SNCA/alpha-synuclein release, thereby generating a hostile microenvironment. *Autophagy* 10: 2171-92
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 276: 2045-2047
- Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ (2008) The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 1638-1643
- Postuma RB, Berg D (2019) Prodromal Parkinson's Disease: The Decade Past, the Decade to Come. *Movement disorders* 34: 665-675
- Pountney DL, Voelcker NH, Gai WPJNR (2005) Annular alpha-synuclein oligomers are potentially toxic agents in alpha-synucleinopathy. *Hypothesis*. 7: 59-67
- Prévot G, Soria FN, Thiolat M-L, Daniel J, Verlhac JB, Blanchard-Desce M, Bezard E, Barthélémy P, Crauste-Manciet S, Dehay B (2018) Harnessing Lysosomal pH through PLGA Nanoemulsion as a Treatment of Lysosomal-Related Neurodegenerative Diseases. *Bioconjugate Chemistry* 29: 4083-4089
- Prinz WA (2014) Bridging the gap: membrane contact sites in signaling, metabolism, and organelle dynamics. *The Journal of cell biology* 205: 759-769
- Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL, Houlden H, Schapira AH (2013) A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 80: 1062-1064
- Prusiner SB (1982) Novel Proteinaceous Infectious Particle Cause Scrapie. *Science* 216
- Rabanal-Ruiz Y, Otten Elsje G, Korolchuk Viktor I (2017) mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays In Biochemistry* 61: 565-584
- Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 38: 1184-91
- Recasens A, Dehay B, Bove J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Perez-Villalba A, Fernagut PO, Blesa J, Parent A, Perier C, Farinas I, Obeso JA, Bezard E, Vila M (2014) Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol* 75: 351-62
- Recasens A, Ulusoy A, Kahle PJ, Di Monte DA, Dehay B (2018) In vivo models of alpha-synuclein transmission and propagation. *Cell and Tissue Research* 373: 183-193

- Rey NL, Steiner JA, Maroof N, Luk KC, Madaj Z, Trojanowski JQ, Lee VMY, Brundin P (2016) Widespread transneuronal propagation of α -synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *The Journal of experimental medicine* 213: 1759-1778
- Reyes JF, Rey NL, Bousset L, Melki R, Brundin P, Angot E (2014) Alpha-synuclein transfers from neurons to oligodendrocytes. *Glia* 62: 387-398
- Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M (2002) Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology* 40: 871-898
- Robak LA, Jansen IE, van Rooij J, Uitterlinden AG, Kraaij R, Jankovic J, International Parkinson's Disease Genomics C, Heutink P, Shulman JM (2017) Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson's disease. *Brain* 140: 3191-3203
- Rodriguez-Araujo G, Nakagami H, Hayashi H, Mori M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Nakaoka Y, Takami Y, Komuro I, Morishita R, Kaneda Y (2013) Alpha-synuclein elicits glucose uptake and utilization in adipocytes through the Gab1/PI3K/Akt transduction pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70: 1123-1133
- Rodriguez-Oroz MC, Obeso JA, Lang AE, Houeto J-L, Pollak P, Rehncrona S, Kulisevsky J, Albanese A, Volkmann J, Hariz MI, Quinn NP, Speelman JD, Guridi J, Zamarbide I, Gironell A, Molet J, Pascual-Sedano B, Pidoux B, Bonnet AM, Agid Y et al. (2005) Bilateral deep brain stimulation in Parkinson's disease: a multicentre study with 4 years follow-up. *Brain* 128: 2240-2249
- Rose F, Hodak M, Bernholc J (2011) Mechanism of copper(II)-induced misfolding of Parkinson's disease protein. *Scientific reports* 1: 11-11
- Ruf VC, Nübling GS, Willikens S, Shi S, Schmidt F, Levin J, Bötzel K, Kamp F, Giese A (2019) Different Effects of α -Synuclein Mutants on Lipid Binding and Aggregation Detected by Single Molecule Fluorescence Spectroscopy and ThT Fluorescence-Based Measurements. *ACS Chemical Neuroscience* 10: 1649-1659
- Ruipérez V, Darios F, Davletov B (2010) Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Progress in Lipid Research* 49: 420-428
- Rusmini P, Cortese K, Crippa V, Cristofani R, Cicardi ME, Ferrari V, Vezzoli G, Tedesco B, Meroni M, Messi E, Piccolella M, Galbiati M, Garrè M, Morelli E, Vaccari T, Poletti A (2019) Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. *Autophagy* 15: 631-651
- Sakamoto M, Uchihara T, Hayashi M, Nakamura A, Kikuchi E, Mizutani T, Mizusawa H, Hirai S (2002) Heterogeneity of Nigral and Cortical Lewy Bodies Differentiated by Amplified Triple-Labeling for Alpha-Synuclein, Ubiquitin, and Thiazin Red. *Experimental Neurology* 177: 88-94
- Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet M-F, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK (2016) Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 167: 1469-1480.e12
- Sanchez-Ferro A, Rabano A, Catalan MJ, Rodriguez-Valcarcel FC, Fernandez Diez S, Herreros-Rodriguez J, Garcia-Cobos E, Alvarez-Santullano MM, Lopez-Manzanares L, Mosqueira AJ, Vela Desojo L, Lopez-Lozano JJ, Lopez-Valdes E, Sanchez-Sanchez R, Molina-Arjona JA (2015) In vivo gastric detection of alpha-synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 30: 517-24
- Santos SF, de Oliveira HL, Yamada ES, Neves BC, Pereira A (2019) The Gut and Parkinson's Disease—A Bidirectional Pathway. *Frontiers in Neurology* 10
- Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A (2009) A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. *Science* 325: 473-477
- Sarkar S, Chigurupati S, Raymick J, Mann D, Bowyer JF, Schmitt T, Beger RD, Hanig JP, Schmued LC, Paule MG (2014) Neuroprotective effect of the chemical chaperone, trehalose in a chronic MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *NeuroToxicology* 44: 250-262
- Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC (2007) Trehalose, a Novel mTOR-independent Autophagy Enhancer, Accelerates the Clearance of Mutant Huntingtin and α -Synuclein. *Journal of Biological Chemistry* 282: 5641-5652
- Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC (2005) Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal of cell biology* 170: 1101-1111

- Sato S, Uchihara T, Fukuda T, Noda S, Kondo H, Saiki S, Komatsu M, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N (2018) Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. *Sci Rep* 8: 2813
- Schapira AHV, Olanow CW, Greenamyre JT, Bezdard E (2014) Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *The Lancet* 384: 545-555
- Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP (1999) Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *The Lancet* 354: 1771-1775
- Schwarz L, Goldbaum O, Bergmann M, Probst-Cousin S, Richter-Landsberg C (2012) Involvement of macroautophagy in multiple system atrophy and protein aggregate formation in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci* 47: 256-66
- Scrivo A, Bourdenx M, Pampliega O, Cuervo AM (2018) Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders. *The Lancet Neurology* 17: 802-815
- Settembre C, Ballabio A (2011) TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. *Autophagy* 7: 1379-81
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (New York, NY)* 332: 1429-1433
- Shimozawa A, Ono M, Takahara D, Tarutani A, Imura S, Masuda-Suzukake M, Higuchi M, Yanai K, Hisanaga S-I, Hasegawa M (2017) Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain. *Acta neuropathologica communications* 5: 12-12
- Shy GM, Drager GA (1960) A Neurological Syndrome Associated with Orthostatic Hypotension: A Clinical-Pathologic Study. *JAMA Neurology* 2: 511-527
- Sian-Hülsmann J, Mandel S, Youdim MBH, Riederer P (2011) The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 118: 939-957
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, Chen C-M, Clark LN, Condroyer C, De Marco EV, Dürr A, Eblan MJ, Fahn S, Farrer MJ, Fung H-C, Gan-Or Z et al. (2009) Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine* 361: 1651-1661
- Silveira CRA, MacKinley J, Coleman K, Li Z, Finger E, Bartha R, Morrow SA, Wells J, Borrie M, Tirona RG, Rupar CA, Zou G, Hegele RA, Mahuran D, MacDonald P, Jenkins ME, Jog M, Pasternak SH (2019) Amboxol as a novel disease-modifying treatment for Parkinson's disease dementia: protocol for a single-centre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Neurology* 19: 20
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J et al. (2003) α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* 302: 841-841
- Sliter DA, Martinez J, Hao L, Chen X, Sun N, Fischer TD, Burman JL, Li Y, Zhang Z, Narendra DP, Cai H, Borsche M, Klein C, Youle RJ (2018) Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature* 561: 258-262
- Soma H, Yabe I, Takei A, Fujiki N, Yanagihara T, Sasaki H (2006) Heredity in multiple system atrophy. *Journal of the Neurological Sciences* 240: 107-110
- Song JX, Lu JH, Liu LF, Chen LL, Durairajan SS, Yue Z, Zhang HQ, Li M (2014) HMGB1 is involved in autophagy inhibition caused by SNCA/alpha-synuclein overexpression: a process modulated by the natural autophagy inducer corynoxine B. *Autophagy* 10: 144-54
- Song W, Wang F, Lotfi P, Sardiello M, Segatori L (2014) 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin promotes transcription factor EB-mediated activation of autophagy: implications for therapy. *J Biol Chem* 289: 10211-22
- Song YJC, Lundvig DMS, Huang Y, Gai WP, Blumbergs PC, Højrup P, Otzen D, Halliday GM, Jensen PH (2007) p25alpha relocalizes in oligodendroglia from myelin to cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *The American journal of pathology* 171: 1291-1303
- Soria FN, Pampliega O, Bourdenx M, Meissner WG, Bezdard E, Dehay B (2017) Exosomes, an Unmasked Culprit in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* 11: 26
- Spencer B, Potkar R, Trejo M, Rockenstein E, Patrick C, Gindi R, Adame A, Wyss-Coray T, Masliah E (2009) Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative

- pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci* 29: 13578-88
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840
- Sprenkle NT, Sims SG, Sánchez CL, Meares GP (2017) Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration* 12: 42
- Stathopoulos PB, Li G-Y, Plevin MJ, Ames JB, Ikura M (2006) Stored Ca²⁺ Depletion-induced Oligomerization of Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM Region: AN INITIATION MECHANISM FOR CAPACITIVE Ca²⁺ ENTRY. *Journal of Biological Chemistry* 281: 35855-35862
- Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA (2001) Expression of A53T Mutant But Not Wild-Type α -Synuclein in PC12 Cells Induces Alterations of the Ubiquitin-Dependent Degradation System, Loss of Dopamine Release, and Autophagic Cell Death. *The Journal of Neuroscience* 21: 9549-9560
- Stefanovic AN, Stockl MT, Claessens MM, Subramaniam V (2014) alpha-Synuclein oligomers distinctively permeabilize complex model membranes. *FEBS J* 281: 2838-50
- Stevens DA, Lee Y, Kang HC, Lee BD, Lee Y-I, Bower A, Jiang H, Kang S-U, Andrabi SA, Dawson VL, Shin J-H, Dawson TM (2015) Parkin loss leads to PARIS-dependent declines in mitochondrial mass and respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 11696-11701
- Stolzenberg E, Berry D, Yang D, Lee EY, Kroemer A, Kaufman S, Wong GCL, Oppenheim JJ, Sen S, Fishbein T, Bax A, Harris B, Barbut D, Zasloff MA (2017) A Role for Neuronal Alpha-Synuclein in Gastrointestinal Immunity. *Journal of Innate Immunity* 9: 456-463
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez J, Schumacker PT (2012) Physiological phenotype and vulnerability in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2: a009290-a009290
- Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM (2017) Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nature reviews Neuroscience* 18: 101-113
- Svensson E, Horváth-Puhó E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, Sørensen HT (2015) Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 78: 522-529
- Tan S, Yu CY, Sim ZW, Low ZS, Lee B, See F, Min N, Gautam A, Chu JJH, Ng KW, Wong E (2019) Pomegranate activates TFEB to promote autophagy-lysosomal fitness and mitophagy. *Sci Rep* 9: 727
- Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, Kurosawa M, Nekooki M, Nukina N (2004) Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine* 10: 148-154
- Tanik SA, Schultheiss CE, Volpicelli-Daley LA, Brunden KR, Lee VM (2013) Lewy body-like alpha-synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *J Biol Chem* 288: 15194-210
- Tanji K, Miki Y, Maruyama A, Mimura J, Matsumiya T, Mori F, Imaizumi T, Itoh K, Wakabayashi K (2015) Trehalose intake induces chaperone molecules along with autophagy in a mouse model of Lewy body disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 465: 746-752
- Tanji K, Odagiri S, Maruyama A, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (2013) Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol Dis* 49: 190-8
- Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R, Langston JW (1999) Parkinson Disease in Twins: An Etiologic Study. *JAMA* 281: 341-346
- Thavanesan N, Gillies M, Farrell M, Green AL, Aziz T (2014) Deep brain stimulation in multiple system atrophy mimicking idiopathic Parkinson's disease. *Case Rep Neurol* 6: 232-7
- Tison F, Yekhlief F, Chrysostome V, Sourgen C (2000) Prevalence of multiple system atrophy. *The Lancet* 355: 495-496
- Torra A, Parent A, Cuadros T, Rodriguez-Galvan B, Ruiz-Bronchal E, Ballabio A, Bortolozzi A, Vila M, Bove J (2018) Overexpression of TFEB Drives a Pleiotropic Neurotrophic Effect and Prevents Parkinson's Disease-Related Neurodegeneration. *Mol Ther* 26: 1552-1567
- Tretiakoff C (1919) Contribution a l'etude de l'Anatomie pathologique du Locus Niger de Soemmering avec quelques deduction relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. *Theses de Paris*
- Tsunemi T, Hamada K, Krainc D (2014) ATP13A2/PARK9 regulates secretion of exosomes and alpha-synuclein. *J Neurosci* 34: 15281-7

- Tsunemi T, Perez-Rosello T, Ishiguro Y, Yoroisaka A, Jeon S, Hamada K, Krishna Vangipuram Suresh M, Wong YC, Xie Z, Akamatsu W, Mazzulli JR, Surmeier DJ, Hattori N, Krainc D (2019) Increased lysosomal exocytosis induced by lysosomal Ca(2+) channel agonists protects human dopaminergic neurons from alpha-synuclein toxicity. *J Neurosci*
- Tysnes OB, Storstein A (2017) Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 124: 901-905
- Ubeda-Bañon I, Saiz-Sanchez D, de la Rosa-Prieto C, Martinez-Marcos A (2014) α -Synuclein in the olfactory system in Parkinson's disease: role of neural connections on spreading pathology. *Brain Structure and Function* 219: 1513-1526
- Ubhi K, Low P, Masliah E (2011) Multiple system atrophy: a clinical and neuropathological perspective. *Trends in Neurosciences* 34: 581-590
- Uchihara T, Nakamura A, Mochizuki Y, Hayashi M, Orimo S, Isozaki E, Mizutani TJAN (2005) Silver stainings distinguish Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions: comparison between Gallyas-Braak and Campbell-Switzer methods. 110: 255-260
- Uéda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 11282-11286
- Uemura N, Yagi H, Uemura MT, Hatanaka Y, Yamakado H, Takahashi R (2018) Inoculation of alpha-synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. *Mol Neurodegener* 13: 21
- Ulusoy A, Phillips RJ, Helwig M, Klinkenberg M, Powley TL, Di Monte DA (2017) Brain-to-stomach transfer of alpha-synuclein via vagal preganglionic projections. *Acta Neuropathol* 133: 381-393
- Ulusoy A, Rusconi R, Perez-Revuelta BI, Musgrove RE, Helwig M, Winzen-Reichert B, Di Monte DA (2013) Caudo-rostral brain spreading of alpha-synuclein through vagal connections. *EMBO Mol Med* 5: 1119-27
- Usenovic M, Tresse E, Mazzulli JR, Taylor JP, Krainc D (2012) Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, alpha-synuclein accumulation, and neurotoxicity. *J Neurosci* 32: 4240-6
- Uversky VN, Li J, Fink AL (2001) Metal-triggered Structural Transformations, Aggregation, and Fibrillation of Human α -Synuclein: A POSSIBLE MOLECULAR LINK BETWEEN PARKINSON'S DISEASE AND HEAVY METAL EXPOSURE. *Journal of Biological Chemistry* 276: 44284-44296
- Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Albanese A, Wood NW (2001) Localization of a Novel Locus for Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism, $\langle em \rangle$ PARK6, $\langle /em \rangle$ on Human Chromosome 1p35-p36. *The American Journal of Human Genetics* 68: 895-900
- Valente EM, Brancati F, Caputo V, Graham EA, Davis MB, Ferraris A, Breteler MMB, Gasser T, Bonifati V, Bentivoglio AR, De Michele G, Dürr A, Cortelli P, Filla A, Meco G, Oostra BA, Brice A, Albanese A, Dallapiccola B, Wood NW et al. (2002) PARK6 is a common cause of familial parkinsonism. *Neurological Sciences* 23: s117-s118
- Valente EM, Brancati F, Ferraris A, Graham EA, Davis MB, Breteler MMB, Gasser T, Bonifati V, Bentivoglio AR, De Michele G, Dürr A, Cortelli P, Wassilowsky D, Harhangi BS, Rawal N, Caputo V, Filla A, Meco G, Oostra BA, Brice A et al. (2002) Park6-linked parkinsonism occurs in several european families. *Annals of Neurology* 51: 14-18
- Valera E, Masliah E (2016) Combination therapies: The next logical Step for the treatment of synucleinopathies? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 31: 225-234
- Valera E, Ubhi K, Mante M, Rockenstein E, Masliah E (2014) Antidepressants reduce neuroinflammatory responses and astroglial alpha-synuclein accumulation in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Glia* 62: 317-337
- Valiente-Gabioud AA, Torres-Monserrat V, Molina-Rubino L, Binolfi A, Griesinger C, Fernández CO (2012) Structural basis behind the interaction of Zn²⁺ with the protein α -synuclein and the A β peptide: A comparative analysis. *Journal of Inorganic Biochemistry* 117: 334-341
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM (2003) Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *American Journal of Epidemiology* 157: 1015-1022

- Van der Perren A, Van den Haute C, Baekelandt V (2015) Viral Vector-Based Models of Parkinson's Disease. In *Behavioral Neurobiology of Huntington's Disease and Parkinson's Disease*, Nguyen HHP, Cenci MA (eds) pp 271-301. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- van Dijk KD, Persichetti E, Chiasserini D, Eusebi P, Beccari T, Calabresi P, Berendse HW, Parnetti L, van de Berg WD (2013) Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 28: 747-54
- van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ, Testers L, Breedveld GJ, Horstink M, Sandkuijl LA, van Swieten JC, Oostra BA, Heutink P (2001) Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *American journal of human genetics* 69: 629-634
- Vila M (2019) Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 0
- Visanji NP, Brotchie JM, Kalia LV, Koprach JB, Tandon A, Watts JC, Lang AE (2016) α -Synuclein-Based Animal Models of Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities in a New Era. *Trends in Neurosciences* 39: 750-762
- Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L (2008) Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 283: 23542-23556
- Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, Meaney DF, Trojanowski JQ, Lee VM (2011) Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 72: 57-71
- Walsh DM, Selkoe DJ (2016) A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* 17: 251
- Wang G-F, Li C, Pielak GJ (2010) 19F NMR studies of α -synuclein-membrane interactions. *Protein science : a publication of the Protein Society* 19: 1686-1691
- Watanabe H, Saito Y, Terao S, Ando T, Kachi T, Mukai E, Aiba I, Abe Y, Tamakoshi A, Doyu M, Hirayama M, Sobue G (2002) Progression and prognosis in multiple system atrophy: An analysis of 230 Japanese patients. *Brain* 125: 1070-1083
- Watts JC, Giles K, Oehler A, Middleton L, Dexter DT, Gentleman SM, DeArmond SJ, Prusiner SB (2013) Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 19555-60
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC (2003) α -Synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 278: 25009-25013
- Wenning GK, Geser F, Krismer F, Seppi K, Duerr S, Boesch S, Köllensperger M, Goebel G, Pfeiffer KP, Barone P, Pellecchia MT, Quinn NP, Koukouni V, Fowler CJ, Schrag A, Mathias CJ, Giladi N, Gurevich T, Dupont E, Ostergaard K et al. (2013) The natural history of multiple system atrophy: a prospective European cohort study. *The Lancet Neurology* 12: 264-274
- Wenning GK, Shlomo YB, Magalhães M, Danie SE, Quinn NP (1994) Clinical features and natural history of multiple system atrophy: An analysis of 100 cases. *Brain* 117: 835-845
- Wenning GK, Tison F, ben Shlomo Y, Daniel SE, Quinn NP (1997) Multiple system atrophy: A review of 203 pathologically proven cases. *Movement Disorders* 12: 133-147
- Williams ET, Glauser L, Tsika E, Jiang H, Islam S, Moore DJ (2018) Parkin mediates the ubiquitination of VPS35 and modulates retromer-dependent endosomal sorting. *Human Molecular Genetics* 27: 3189-3205
- Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E, Gage FH, Riek R (2011) In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 4194-4199
- Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA, Lichtenberg M, Menzies FM, Ravikumar B, Imarisio S, Brown S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (2010) alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol* 190: 1023-37
- Wu Y, Li X, Zhu JX, Xie W, Le W, Fan Z, Jankovic J, Pan T (2011) Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *Neuro-Signals* 19: 163-174
- Wüllner U, Schmitt I, Kammal M, Kretschmar HA, Neumann M (2009) Definite multiple system atrophy in a German family. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 80: 449-450

- Xilouri M, Brekk OR, Landeck N, Pitychoutis PM, Papisilekas T, Papadopoulou-Daifoti Z, Kirik D, Stefanis L (2013) Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates alpha-synuclein-induced neurodegeneration. *Brain* 136: 2130-46
- Xilouri M, Brekk OR, Polissidis A, Chrysanthou-Piterou M, Kloukina I, Stefanis L (2016) Impairment of chaperone-mediated autophagy induces dopaminergic neurodegeneration in rats. *Autophagy* 12: 2230-2247
- Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, Park D, Stefanis L (2009) Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS One* 4: e5515
- Xiong N, Jia M, Chen C, Xiong J, Zhang Z, Huang J, Hou L, Yang H, Cao X, Liang Z, Sun S, Lin Z, Wang T (2011) Potential autophagy enhancers attenuate rotenone-induced toxicity in SH-SY5Y. *Neuroscience* 199: 292-302
- Xu YH, Sun Y, Ran H, Quinn B, Witte D, Grabowski GA (2011) Accumulation and distribution of alpha-synuclein and ubiquitin in the CNS of Gaucher disease mouse models. *Mol Genet Metab* 102: 436-47
- Yan F, Chen Y, Li M, Wang Y, Zhang W, Chen X, Ye Q (2018) Gastrointestinal nervous system α -synuclein as a potential biomarker of Parkinson disease. *Medicine* 97: e11337-e11337
- Yan J-Q, Yuan Y-H, Gao Y-N, Huang J-Y, Ma K-L, Gao Y, Zhang W-Q, Guo X-F, Chen N-H (2014) Overexpression of Human E46K Mutant α -Synuclein Impairs Macroautophagy via Inactivation of JNK1-Bcl-2 Pathway. *Molecular Neurobiology* 50: 685-701
- Yang Q, She H, Gearing M, Colla E, Lee M, Shacka JJ, Mao Z (2009) Regulation of neuronal survival factor MEF2D by chaperone-mediated autophagy. *Science* 323: 124-7
- Yap TL, Gruschus JM, Velayati A, Westbrook W, Goldin E, Moaven N, Sidransky E, Lee JC (2011) Alpha-synuclein interacts with Glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. *J Biol Chem* 286: 28080-8
- Yin Y, Sun G, Li E, Kiselyov K, Sun D (2017) ER stress and impaired autophagy flux in neuronal degeneration and brain injury. *Ageing research reviews* 34: 3-14
- Youdim MBH, Wadia A, Tatton W, Weinstock M (2001) The Anti-Parkinson Drug Rasagiline and Its Cholinesterase Inhibitor Derivatives Exert Neuroprotection Unrelated to MAO Inhibition in Cell Culture and in Vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences* 939: 450-458
- Youle RJ, Narendra DP (2010) Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 9
- Zaffagnini G, Martens S (2016) Mechanisms of Selective Autophagy. *Journal of molecular biology* 428: 1714-1724
- Zavodszky E, Seaman MNJ, Moreau K, Jimenez-Sanchez M, Breusegem SY, Harbour ME, Rubinsztein DC (2014) Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nature Communications* 5: 3828
- Zhang B, Kehm V, Gathagan R, Leight SN, Trojanowski JQ, Lee VMY, Luk KC (2019) Stereotaxic Targeting of Alpha-Synuclein Pathology in Mouse Brain Using Preformed Fibrils. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 1948: 45-57
- Zheng Q, Huang T, Zhang L, Zhou Y, Luo H, Xu H, Wang X (2016) Dysregulation of Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience* 8
- Zhu M, Qin Z-J, Hu D, Munishkina LA, Fink AL (2006) α -Synuclein Can Function as an Antioxidant Preventing Oxidation of Unsaturated Lipid in Vesicles. *Biochemistry* 45: 8135-8142
- Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, Graf E, Eck Sebastian H, Offman Marc N, Haubenberger D, Spielberger S, Schulte Eva C, Lichtner P, Rossle Shaila C, Klopp N, Wolf E, Seppi K, Pirker W, Presslauer S, Mollenhauer B, Katzenschlager R, Foki T, Hotzy C et al. (2011) A Mutation in $\langle em \rangle VPS35 \langle /em \rangle$, Encoding a Subunit of the Retromer Complex, Causes Late-Onset Parkinson Disease. *The American Journal of Human Genetics* 89: 168-175
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM et al. (2004) Mutations in $\langle em \rangle LRRK2 \langle /em \rangle$ Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron* 44: 601-607
- Zondler L, Kostka M, Garidel P, Heinzelmann U, Hengerer B, Mayer B, Weishaupt JH, Gillardon F, Danzer KM (2017) Proteasome impairment by α -synuclein. *PloS one* 12: e0184040-e0184040

Titre : Approches multifactorielles et translationnelles dans la modélisation des synucléinopathies : implications mécanistiques et thérapeutiques

Résumé : Mon projet de thèse a été dédié à l'étude des synucléinopathies. Ces maladies neurodégénératives sont caractérisées par la présence d'inclusions intracytoplasmiques positives pour l' α -synucléine et contenues dans les neurones pour la maladie de Parkinson ou dans les oligodendrocytes pour l'atrophie multisystématisée. L'objectif de mon travail de thèse fut de proposer une approche multifactorielle et translationnelle en développant les aspects de modélisation, de mécanistique et de thérapeutique, associés aux synucléinopathies. Dans un modèle primate non-humain de la maladie de Parkinson, nous avons souligné le rôle toxique de la protéine α -synucléine et mis en lumière de nouveaux processus cellulaires impliqués dans le phénomène de neurodégénérescence. Dans ce même modèle animal, nous avons démontré l'existence d'une route bidirectionnelle de propagation et de neurodégénérescence de la protéine α -synucléine entre le système nerveux central et entérique. Enfin, nous nous sommes concentrés sur le rétablissement de la fonction autophagique comme cible thérapeutique commune aux synucléinopathies. Nous avons ainsi pu démontrer qu'une restauration de la machinerie de dégradation de la voie autophagie était suffisante pour rétablir les taux physiologiques de la protéine α -synucléine et induire une neuroprotection dans un modèle rongeur de la maladie de Parkinson et d'atrophie multisystématisée. Ces travaux corroborent le rôle clé de la protéine α -synucléine dans l'étiologie des synucléinopathies et proposent de nouvelles stratégies thérapeutiques communes à toutes les synucléinopathies afin de rétablir les niveaux physiologiques cellulaires de la protéine et induire une neuroprotection au sein du système nerveux central.

Mots clés : neuropathologie, neurodégénérescence, synucléinopathie, mécanistique, thérapeutique.

Title: Multifactorial and translational approaches for modeling synucleinopathies: mechanistic and therapeutic implications

Abstract: My thesis project was dedicated to the study of synucleinopathies. Synucleinopathies are neurodegenerative diseases characterized by the presence of α -synuclein-positive intracytoplasmic inclusions which are present either in neurons for Parkinson's disease or in oligodendrocytes for Multiple system atrophy. The aim of my work was to establish a multifactorial and translational approach through modeling, mechanistic and therapeutic aspects associated with synucleinopathies. Using a non-human primate model of Parkinson's disease, we confirmed the toxic role of α -synuclein in the pathology and highlighted unpredictable cellular processes involved in neurodegeneration. Using the same model, we demonstrated a bidirectional route of propagation of α -synuclein between the central and enteric nervous systems. Finally, we focused on the restoration of the autophagic function as a potential common therapeutic target for all synucleinopathies. Through a gene-based restoration of autophagy, we efficiently reestablished α -synuclein physiological protein levels, while inducing neuroprotection in Parkinson's disease and Multiple system atrophy rodent models. Thus, this work corroborates the key role of α -synuclein in the etiology of synucleinopathy and offers new common therapeutic strategies for all synucleinopathies to decrease α -synuclein-induced toxicity into the central nervous system.

Keywords: neuropathology, neurodegeneration, synucleinopathy, mechanistic, therapeutic.

Unité de recherche

Institut des Maladies Neurodégénératives, CNRS UMR 5293, Centre Broca Nouvelle-Aquitaine,
146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux, France