



HAL
open science

Typage moléculaire des maladies neurodégénératives dues à l'agrégation de la protéine alpha synucléine

Alexis Fenyi

► **To cite this version:**

Alexis Fenyi. Typage moléculaire des maladies neurodégénératives dues à l'agrégation de la protéine alpha synucléine. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS053 . tel-02476810v2

HAL Id: tel-02476810

<https://theses.hal.science/tel-02476810v2>

Submitted on 18 Feb 2020

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.

Typage moléculaire des maladies neurodégénératives dues à l'agrégation de la protéine α -synucléine

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°568 Signalisations et réseaux
intégratifs en biologie (BIOSIGNE)
Spécialité de doctorat: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 13 Février 2019, par

Mr Alexis FENYI

Composition du Jury :

Charles DUYCKAERTS Professeur, Université Paris 6 (Hôpital Pitié Salpêtrière)	Président
Anja BÖCKMANN Directeur de recherche, Université de Lyon (Institut de Biologie et Chimie des Protéines)	Rapporteur
Luc BUEE Directeur de recherche, Université de Lille (Centre de recherche Jean-Pierre Aubert)	Rapporteur
Philippe HANTRAYE Directeur de recherche, Université Paris-Saclay (MIRCen - CEA)	Examineur
Luc BOUSSET Chargé de recherche, Université Paris-Saclay (MIRCen - CEA)	Co-Directeur de thèse
Ronald MELKI Directeur de recherche, Université Paris-Saclay (MIRCen - CEA)	Co-Directeur de thèse

Titre : Typage moléculaire des maladies neurodégénératives dues à l'agrégation de la protéine α -synucléine

Mots clés : α -synucléine ; maladie de Parkinson ; démences à corps de Lewy ; atrophie multi-systématisée ; maladies neurodégénératives ; prion

Résumé : Les synucléinopathies regroupent les maladies neurodégénératives de Parkinson, les démences à corps de Lewy et l'atrophie multi-systématisée. Des études suggèrent que les synucléinopathies seraient des maladies à prion. Aujourd'hui, certains aspects manquent pour que l' α -synucléine soit reconnue comme un prion. Par exemple, il est à démontrer que chaque synucléinopathie est causée par une souche précise d' α -synucléine. Durant ma thèse j'ai mis au point une méthode d'amplification fiable des dépôts présents dans le cerveau des patients atteints de synucléinopathies. J'ai aussi documenté les procédures de nettoyage à adopter envers des matériels souillés, par diverses fibres amyloïdes, afin de réduire le risque de contamination. Finalement, j'ai été associé à une étude montrant les capacités de propagation d'assemblages d' α -synucléine, dans un réseau de neurones humains en culture. Ces résultats permettront des études structurales, et fonctionnelles, des souches d' α -synucléine dans les synucléinopathies.

Title : Molecular typing of neurodegenerative diseases due to the aggregation of the protein α -synuclein

Keywords : α -synuclein ; Parkinson's disease ; dementia with Lewy bodies ; multiple system atrophy; neurodegeneratives diseases ; prion

Abstract : The aggregation of α -synuclein protein has been shown to be associated with Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy, called synucleinopathies. Increasing amount of evidences suggest that synucleinopathies are prion diseases. Some aspects are missing for α -synuclein to be recognized as a prion, such as the existence of strains associated to synucleinopathies. During my thesis I set up a reliable method to amplify α -synuclein-rich deposits from patients tissues. I validated the method using all synucleinopathies tissues. This should allow the identification of α -synuclein strain related to each synucleinopathy. In addition, I also documented cleaning procedures for materials soiled with various amyloid fibers, in order to reduce the risk of contamination. Finally, I was associated to a study that shows the propagation abilities of different α -synuclein assemblies in a neuronal network mimicking human cortico-cortical connections. These results open the way to structural and functional studies of the amplified deposits.



A ma mère, Viviane Morin

“Overcome the devils with a thing called love.”

Bob Marley

Remerciements

"Je ne sais qu'une chose, c'est que je ne sais rien"

Socrate

En premier lieu je tiens à remercier Anja Böckmann, Luc Buée, Charles Duyckaerts et Philippe Hantraye d'avoir accepté de consacrer du temps afin de lire ma thèse et juger mon travail.

Cette thèse fut assez mouvementée, avec deux déménagements qui m'ont permis de croiser le chemin d'un certain nombre de personnes. Pour cela, je tiens à présenter mes excuses à l'avance auprès de ceux que je n'aurais pas cités. Je tiens en effet à remercier toutes les personnes ayant participé, de près ou de loin, à ma thèse.

Luc et Ronald : Je tenais à vous remercier tout d'abord pour m'avoir permis de faire mon stage de M2 et ma thèse avec vous. Je vous remercie aussi pour les projets annexes que vous m'avez confiés et qui m'ont permis d'étoffer mes connaissances biologiques et techniques. Je vous remercie pour tout le savoir que vous m'avez transmis. Vous m'avez, chacun à votre manière, offert la possibilité de progresser et c'est une vraie chance d'avoir été encadré par des personnes telles que vous. Et enfin, et pas des moindres, je vous remercie pour vos relectures, corrections et remarques que vous avez apportées à mon manuscrit.

Dans la continuité, je remercie aussi tous les membres de l'équipe, passés comme présents, pour avoir toujours été là pour répondre à mes questions et m'aider. Un petit remerciement particulier à Elodie qui m'a permis de donner un cours magistral à des masters 2 complétant ainsi mon parcours d'enseignement. Une pensée spéciale à Laurent et Stéphane pour les débats scientifiques et surtout non scientifiques qui ont pu s'éterniser. Je tiens aussi à remercier, ou plutôt présenter mes excuses auprès d'Audrey, Emilie et Tracy. J'ai pu énormément rire avec vous et les journées étaient parfois bien trop courtes. Les excuses sont surtout pour les vacheries que je vous ai faites mais comme j'ai toujours dit " qui aime bien, châtie

bien !!! ". Et je remercie encore toute l'équipe mais cette fois-ci pour tous les moments " off ", notamment lors de la pause thé. Ces gâteaux et bonbons réguliers, le tout arrosé de thé et accompagné de discussions ou de débats ont vraiment été un plaisir pour moi.

Tracy, je te remercie aussi pour ce que tu fais pour l'équipe : préparer les tampons, la laverie, le matériel et j'en passe... Tu m'as énormément aidé et fais gagner un temps considérable. En plus, tu es toujours dans la joie et la bonne humeur ! Bref, tu es une personne formidable qui rend le travail tellement agréable.

Je remercie Patrick Parra pour m'avoir laissé, avec Luc, passer des heures dans son atelier à " jouer " avec ses machines pour construire mes boîtes et couper nos baguettes. Tu es un puits de connaissances et rien ne semble impossible à faire avec toi ! J'en profite pour remercier Angélique Nicolas, Odile Lecquyer et Jeanne Triki pour tout le côté administratif. Vous faites un super boulot et m'avez grandement facilité la vie, surtout que l'administratif et moi ça fait deux.

Bien évidemment je remercie aussi toutes les personnes de MIRCen. C'est un vrai bonheur de travailler chez vous pour l'ambiance qui y règne. A se demander si on est bien au travail parfois ! Bien sûr, je remercie particulièrement Noëlle Dufour pour la formation et l'aide qu'elle m'a donné pour accéder au L3, mon deuxième ou peut-être même premier bureau. C'est toujours un plaisir de parler et d'échanger avec toi. Je remercie aussi Kristell Bastide, Laurent Vincent et Pascal Wodling pour l'aide que vous avez apportée à l'installation de l'équipe à MIRCen et pour que je m'installe dans le L3.

Je tenais à remercier toutes les enseignantes et tous les enseignants que j'ai eu dans mon cursus et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre et en particulier Hélène Débat. Tu m'as toujours poussé à donner le meilleur et surtout tu as su, à juste titre, que l'équipe de Ronald serait parfaite pour moi. Je te remercie aussi de m'avoir permis d'enseigner, sans toi je sais que ça n'aurait pas été possible. Ça a été une vraie chance d'avoir été suivi par quelqu'un comme toi alors encore merci pour tout !

Je remercie aussi mon père et mes frères pour m'avoir soutenu toutes ces années et m'avoir permis de continuer mes études aussi loin. J'en profite pour remercier ma deuxième famille Alba, Amine, Aymen, Benji, Jérôme, Julien et Vincata sans oublier, bien évidemment, ma " copine des Essarts " : Caro. Même si je suis discret sur mon travail, vous avez toujours été là pour moi, toujours là pour que je pense à autre chose, toujours là pour me soutenir. Ces années auraient été bien plus compliquées sans vous. Bref merci les gars, vous êtes géniaux ! Et je remercie particulièrement ma copine, Lucie. Je t'en ai fait voir de toutes les couleurs durant ces quelques années mais tu as toujours été là pour m'aider et me soutenir. En plus, tu m'as énormément aidé lors de ma rédaction de thèse et lors de la préparation de la soutenance. Alors pour tout ça et tout le reste merci !

Enfin, je terminerai en remerciant ma mère. Si j'en suis là, aujourd'hui, c'est grâce à toi. Tu m'as toujours soutenu et défendu durant mes années sombres dira-t-on. Tu es la raison qui me pousse à travailler dans ce domaine et lutter contre ces maladies. Tout ce que je peux espérer, aujourd'hui, c'est qu'un jour des familles n'auront plus à vivre cela. Dans tous les cas, pour tout ce que tu as pu m'apporter et le soutien que tu m'as fourni, je tiens aujourd'hui à te dédier l'ensemble de mes travaux et tous ceux qui arriveront par la suite. Merci maman !

SOMMAIRE

Index des illustrations.....	10
Abréviations.....	11
Résumé	12
Introduction	15
I. Historique des maladies à prion.....	17
A. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles	17
1. Historique des encéphalopathies spongiformes transmissibles	17
2. PrP : la cause des encéphalopathies spongiformes transmissibles.....	19
B. Biochimie de l'agrégation	21
1. Le repliement des protéines.....	21
2. De la structure native à l'agrégat	23
C. La complexité de l'étude des maladies à prion	26
1. Le principe de souches.....	26
2. Le phénomène de barrière d'espèces.....	29
II. Les maladies parkinsoniennes	31
A. La maladie de Parkinson	31
1. Présentation.....	31
2. Les symptômes et le diagnostic.....	32
3. La théorie de Braak.....	34
B. Les démences à corps de Lewy.....	36
1. Présentation.....	36
2. Les symptômes et le diagnostic.....	37
3. L'histopathologie	38
C. L'atrophie multi-systématisée.....	39
1. Présentation.....	39
2. Les symptômes et le diagnostic.....	40
3. L'histopathologie	41
III. Des maladies parkinsoniennes aux synucléinopathies	42
A. Découverte de l' α -synucléine.....	42
1. L' α -synucléine dans les maladies parkinsoniennes	42
2. Historique des synucléines	45
B. Description de l' α -synucléine	46

1.	<i>La séquence de l'α-synucléine</i>	46
2.	<i>Le rôle de l'α-synucléine</i>	47
C.	L'α-synucléine dans les synucléinopathies	48
1.	<i>Epidémiologie des synucléinopathies</i>	48
2.	<i>D'une forme saine à une forme pathologique</i>	49
3.	<i>Les mutations de l'α-synucléine</i>	52
4.	<i>La structure toxique des fibres d'α-synucléine</i>	53
IV.	Les synucléinopathies : des maladies prions ?	53
1.	<i>La forme prion a une structure différente de la forme native</i>	54
2.	<i>La pathologie nécessite l'expression de la protéine prion</i>	54
3.	<i>La forme prion peut recruter la protéine endogène saine</i>	56
4.	<i>La forme prion résiste à la protéolyse</i>	56
5.	<i>La forme prion s'accumule dans les tissus</i>	57
6.	<i>La forme prion induit la dégénérescence cellulaire</i>	57
7.	<i>Existence d'une barrière d'espèces</i>	60
8.	<i>La forme prion se propage de cellule à cellule</i>	60
9.	<i>Il existe un phénomène de souches pouvant causer différentes pathologies</i>	61
10.	<i>Conclusions</i>	63
	Travaux de thèse	65
I.	Mise en place d'une méthode fiable d'amplification des assemblages amyloïdes d'α-synucléine présents dans des tissus de patients atteints de synucléinopathies	67
II.	Mise en évidence d'agents permettant la décontamination de matériels de laboratoire souillés par diverses protéines en fibres amyloïdes	91
III.	Etude de la propagation de différents assemblages d'α-synucléine dans un réseau de neurones corticaux induits	107
	Conclusions et perspectives	135
I.	Conclusions	137
A.	La PMCA comme outil d'étude des synucléinopathies	137
B.	Procédures de décontamination des fibres amyloïdes	140
C.	Propagation d'assemblages d'α-synucléine dans un réseau de neurones	141

II. Perspectives.....	142
A. Caractérisation structurale des dépôts amplifiés.....	142
1. La protéolyse ménagée	143
2. La microscopie électronique	143
3. La spectrométrie de masse.....	144
4. La résonance magnétique nucléaire à l'état solide	144
B. Caractérisation fonctionnelle des dépôts amplifiés	145
1. Mesurer les propriétés de propagation des souches	145
2. Tester la pathogénicité.....	145
3. Identification des partenaires des fibres issues d'amplification	146
C. Vers une généralisation de la caractérisation des synucléinopathies par PMCA	146
D. Utilisation des agrégats amplifiés pour la recherche translationnelle..	147
E. Vers une méthode de diagnostic ?.....	149
Bibliographie	151

Index des illustrations

Sommaire des figures :

Figure 1 : Exemples d'encéphalopathies spongiformes transmissibles.....	18
Figure 2 : Schéma des niveaux d'énergies des protéines lors de leurs repliements et agrégations.....	22
Figure 3 : Schéma de l'agrégation d'une protéine nativement non-repliée.....	25
Figure 4 : Illustration du phénomène de souches.....	28
Figure 5 : Représentations des stades de Braak.....	35
Figure 6 : Marquage histologique des dépôts selon la maladie parkinsonienne.....	39
Figure 7 : Suivi d'agrégation illustré par des images de microscopie électronique...	44
Figure 8 : Illustrations des principales caractéristiques de séquence et de structure de l' α -synucléine.....	46
Figure 9 : Structures amyloïdes de deux souches d' α -synucléine.....	55
Figure 10 : Propagation de fibres amyloïdes d' α -synucléine en culture cellulaire	56
Figure 11 : Profils de protéolyses ménagées de deux souches d' α -synucléine.....	57
Figure 12 : Potentiels mécanismes de toxicité d'une fibre amyloïde	59
Figure 13 : Comparaison de la localisation des dépôts protéiques après injection de deux souches d' α -synucléine chez le rat.....	62
Figure 14 : Réplication du prion PrP durant le développement d'une des encéphalopathies spongiformes transmissibles	69
Figure 15 : Schéma du fonctionnement de la PMCA.....	70
Figure 16 : Schéma des différents isoformes de la protéine Tau issus d'un épissage alternatif.....	93

Sommaire des tableaux :

Tableau 1 : Principales protéinopathies connues et leurs protéines associées.....	30
Tableau 2 : Relation entre les stades de Braak, la localisation des dépôts et les symptômes du patient.....	35
Tableau 3 : Comparaison des principales caractéristiques des maladies parkinsoniennes	37
Tableau 4 : Stades proposés pour l'évolution de l'atrophie multi-systématisée.....	42
Tableau 5 : Relation entre les différentes tauopathies et la nature de l'isoforme de la protéine Tau retrouvée dans les agrégats	93

Abréviations

ANT :	A denine N ucleotide T ranslocator soit translocateur de nucléotides à adénine
CJD :	C reutzfeldt- J akob's D isease soit maladie de Creutzfeldt-Jakob
DLB :	D ementia with L ewy B odies soit démences à corps de Lewy
LB :	L ewy B ody soit corps de Lewy
L-DOPA :	Dopamine
LRRK2 :	L eucine- R ich- R epeat- K inase 2 soit kinase 2 riche en répétitions de leucine
MPTP :	1- M éthyl-4- P hényl-1,2,3,6- T étrahydro P yridine
MSA :	M ultiple S ystem A trophia soit atrophie multi-systématisée
MSA-C :	MSA cérébelleuse
MSA-P :	MSA avec parkinsonisme
NAC :	N on- A myloïde- β C omponent soit composant non amyloïde β
PCR :	P olymerase C hain R eaction soit réaction en chaîne de la polymérase
PMCA :	P rotein M isfolding C yclic A mplification soit amplification cyclique de protéines mal-repliées
Prion :	Proteinaceous Infectious particle soit particule infectieuse protéique
PrP :	P rotéine P rion
PrP ^c :	Forme cellulaire de PrP, soit la forme native
PrP ^{sc} :	Forme " scrapie " de PrP, soit agrégée
ROS :	R eactive O xygen S pecies soit espèces réactives de l'oxygène
RT-QuIC :	R eal- T ime Q uaking I nduced C onversion soit conversion induite par agitation en temps réel
SNARE :	S oluble N -éthylmaleimide-sensitive-factor A ttachment protein R Eceptor soit le récepteur membranaire de la protéine d'attachement au facteur soluble sensible au N-éthylmaléimide
SNCA :	Gène codant la protéine α -synucléine
SNpc :	S ubstance N oire p ars c ompacta
TRAP :	T remblement au repos, R igidité, A kinésie/ bradykinésie, instabilité P osturale
UCH-L1 :	U biquitine C arboxy-ter H ydrolase L1
UPS :	U biquitin- P roteasome S ystem soit système ubiquitine-protéasome
VDAC :	V oltage- D ependent A nion C hannel soit canal anionique voltage-dépendant

Résumé

Les synucléinopathies sont des maladies neurodégénératives liées à l'agrégation de l' α -synucléine en fibres amyloïdes. Elles regroupent la maladie de Parkinson, les démences à corps de Lewy et l'atrophie multi-systématisée. De plus en plus de travaux suggèrent que l' α -synucléine aurait, dans les synucléinopathies, un mode d'action similaire à celui du prion PrP dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles. En effet, la forme pathologique de l' α -synucléine a une structure différente de la forme native ; nécessite son expression par l'hôte pour développer la maladie ; incorpore la protéine endogène ; présente une résistance accrue à la protéolyse ; s'accumule dans les tissus ; est associée à la dégénérescence cellulaire ; présente un phénomène de barrière d'espèces ; se propage dans l'hôte ; et présente un phénomène de souches.

Aujourd'hui, deux propriétés manquent aux synucléinopathies pour être considérées comme des maladies à prion. Premièrement, l'aspect contagieux (infection par voie orale, respiratoire ou iatrogène) n'a pas été démontré. Deuxièmement, il n'a jamais été démontré que, pour chacune des synucléinopathies, il y a une souche précise d' α -synucléine. Cependant, ceci est fortement suggérée car certaines souches, produites *in vitro*, peuvent conduire au développement d'inclusions caractéristiques d'une synucléinopathie.

L'objectif principal de ma thèse a été de mettre en place une technique permettant d'amplifier les agrégats d' α -synucléine de chaque synucléinopathie. Pour cela, j'ai adapté la technique de PMCA, pour "**Protein Misfolding Cyclic Amplification**", qui peut être traduit par "l'amplification cyclique de protéines mal-repliées". Cette technique, qui fut développée à l'origine pour le prion PrP, permet

d'amplifier la forme pathogène d'une protéine, en quelques heures, tout en conservant la structure amyloïde des agrégats originaux. Au cours de ma thèse, j'ai pu amplifier spécifiquement les dépôts présents dans le cerveau de patients atteints de maladie de Parkinson, de démences à corps de Lewy ou d'atrophie multi-systématisée. J'ai pu confirmer, par des images de microscopie électronique à transmission, la nature amyloïde de ces assemblages amplifiés. Ces fibres serviront par la suite pour des caractérisations structurales et fonctionnelles, et en injection à des animaux. Ainsi, il sera possible de connaître les relations structure-fonction des assemblages selon la pathologie originelle.

Dans ce manuscrit, je vais principalement évoquer une étude que nous avons menée conjointement avec le docteur Pascal Derkinderen. Ce projet a eu pour but de tester l'hypothèse de Braak, selon laquelle des agrégats d' α -synucléine sont présents, précocement, au niveau du tube digestif dans la maladie de Parkinson. Pour cela, nous avons analysé à l'aveugle, par histologie et par PMCA, des biopsies provenant de l'antrum, du côlon sigmoïde ou du rectum de patients atteints de la maladie de Parkinson. Au final, nous avons mis en évidence que le côlon sigmoïde et l'antrum sont les régions où les biopsies ont montré la plus grande fiabilité. En revanche, pour les biopsies du rectum, ni l'analyse histologique, ni la PMCA n'ont mis en avant la présence spécifique de dépôts. Ainsi nous avons conclu que cette région n'est pas adaptée pour l'analyse de biopsies. Il est tout de même important de noter que, même avec des biopsies du côlon sigmoïde, certains patients atteints de la maladie de Parkinson n'ont été détectés positifs par aucune des deux méthodes. Ces résultats rejoignent d'autres études qui rapportent que, dans la maladie de Parkinson, la présence de dépôts dans le système nerveux entérique n'est pas nécessairement systématique, et forme un gradient rostro-caudal le long du tractus digestif.

Dans une seconde partie, je me suis intéressé aux précautions à prendre pour la manipulation des fibres amyloïdes. En effet, l' α -synucléine, Tau et A β sont suspectées d'avoir un mode d'action similaire à celui du prion PrP. Dans un but préventif, nous avons documenté les procédures de décontamination à adopter envers les matériels de laboratoire ayant été en contact avec la forme fibrillaire de chacune de ces protéines. Pour cela, nous avons testé les capacités de plusieurs agents à détacher et dépolymériser les assemblages amyloïdes fixés sur différentes surfaces. Les résultats ont été compilés dans une représentation unique, simple de lecture, qui permet, en fonction de l'assemblage et de la nature du matériel, de connaître le meilleur agent à utiliser pour la décontamination.

Enfin, dans une dernière partie, j'ai participé à une étude portant sur la propagation de différents assemblages d' α -synucléine dans des neurones humains induits et orientés. De nombreuses études ont rapporté la capacité de propagation des assemblages *in vivo*, ou dans des cultures cellulaires primaires. L'intérêt de cette étude est de s'approcher des conditions retrouvées dans le cerveau humain (protéome, type de cellules). En effet, par l'utilisation de cellules pluripotentes humaines, induites en neurones dans un système de microfluidique, il a été possible de simuler un réseau neuronal de connexions cortico-corticales. Ainsi, il a été démontré pour deux souches d' α -synucléine, qu'elles possèdent la capacité de rentrer dans les neurones humains, de s'y multiplier, de former des inclusions d' α -synucléine phosphorylées et d'être transmis à d'autres neurones via leurs axones.

Introduction

I. Historique des maladies à prion

Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, un dogme voulait que les maladies infectieuses soient causées par trois grands groupes d'agents : les parasites, les bactéries et les virus. Les premiers écrits concernant les infections parasitaires remontent à l'Egypte antique vers 1500 avant J.C.. Le papyrus d'Ebers, découvert à Thèbes en 1872, décrit ce qui s'apparente être une infection de parasite (Bryan, 1930). Les bactéries sont décrites à partir du 17^{ème} siècle en partie grâce à l'observation de celles-ci par Antoni van Leeuwenhoek (Leeuwenhoek, 1673). Cependant, les bactéries ne seront vraiment décrites comme pathogène qu'à la fin du 19^{ème} siècle par Pasteur, qui insistera d'ailleurs sur l'utilisation de matériels médicaux et salles d'opérations aseptiques (Pasteur et al., 1878). Pour la famille des virus, c'est en 1892 que Ivanovski isola et décrivit un pathogène, plus petit que les bactéries, et causant la mosaïque du tabac chez les plantes (Ivanovski, 1892). Cependant, il pensa à une toxine de bactérie. Ce n'est qu'en 1898, par des expériences similaires, que Beijerinck parlera de virus (Beijerinck, 1898). Depuis, il était admis que les maladies infectieuses étaient provoquées par des parasites, des bactéries, ou des virus. Pourtant, au cours du 20^{ème} siècle, un nouvel agent infectieux allait être décrit, révolutionnant des concepts de biologie : le prion.

A. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles

1. Historique des encéphalopathies spongiformes transmissibles

En 1732, le premier cas de ce qui sera défini plus tard comme une maladie prion, fut décrit chez un troupeau de mouton en Grande-Bretagne (Mc Gowan, 1922). Cette maladie, où le bétail se frotte à des pierres ou des arbres pour soulager des

démangeaisons, fut appelée, un siècle plus tard, la tremblante du mouton (Fig. 1A) (Hurtrel d'Arboval, 1828). Tout au long du 20^{ème} siècle des maladies semblables, notamment sur l'aspect spongieux du cerveau, seront décrites chez l'Homme. Tout d'abord, la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD), découverte simultanément par Hans Gerhard Creutzfeldt et Alfons Maria Jakob, fut décrite comme un syndrome neuropathologique avec de nombreux troubles plutôt qu'une maladie à ce moment (Fig. 1B) (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). En 1956, Gajdusek et Zigas notèrent que la tribu Foré, de l'actuelle Papouasie-Nouvelle Guinée, était atteinte d'une maladie semblable à la CJD et à la tremblante du mouton (Gajdusek et Zigas, 1959). Cette maladie fut nommée Kuru, provenant du langage indigène local et voulant dire " trembler de peur " (Fig. 1C). Rapidement, la CJD et le Kuru furent décrites comme étant différentes formes de la même neuropathie (Hadlow, 1959).

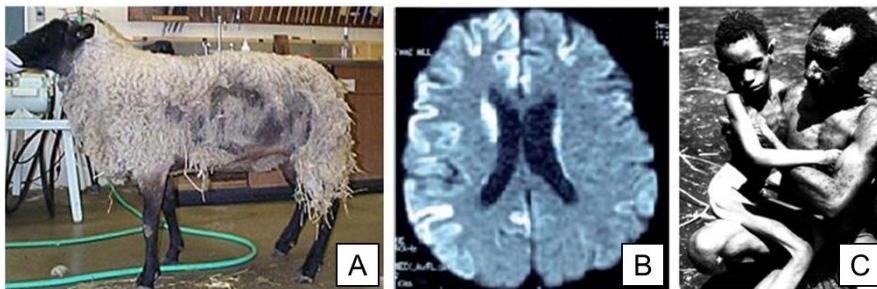


Figure 1 : Exemples d'encéphalopathies spongiformes transmissibles. A : Photo d'un mouton atteint de la tremblante du mouton (Garey, 2015). B : Imagerie par résonance magnétique de diffusion d'un patient atteint de CJD. Des intensités surélevées du signal sont détectées au niveau du cortex et du thalamus, ce qui est une marque de la CJD (Bozluolcay et al., 2014). C : Photo d'un adolescent en phase terminale de la maladie du Kuru avec incapacité totale de communiquer et de se tenir debout seul (Liberski, 2009).

L'injection à des moutons sains d'homogénats de cerveaux, ou de liquides céphalo-rachidiens, de moutons infectés permet de démontrer que l'agent responsable de la tremblante du mouton est infectieux (Cuillé et Chelle, 1936).

Concernant le Kuru, celui-ci fut supposé infectieux notamment par la conclusion que cette maladie provenait de l'alimentation de la tribu (Klitzman et al., 1984). En effet, jusque dans les années 50, la tribu pouvait pratiquer le cannibalisme dans le cadre de rites funéraires. Ainsi, les hommes de la tribu mangeaient des muscles humains, tandis que les femmes et les enfants mangeaient le cerveau. Or, il fut remarqué que les femmes étaient bien plus affectées que les hommes. Ceci permit de conclure que la contamination provenait de la consommation du système nerveux des morts. A la fin des années 60, cet aspect infectieux fut confirmé chez des chimpanzés qui, après injection de tissus de personnes atteintes de Kuru, développèrent la maladie (Gajdusek et al., 1966). De la même manière, ce résultat put être étendu à la CJD deux ans plus tard, démontrant ainsi l'aspect infectieux de ces deux maladies (Gibbs et al., 1968; Beck et al., 1969). Ces pathologies furent rassemblées dès lors sous le terme d'encéphalopathies spongiformes transmissibles, qui englobe d'autres maladies telle que l'insomnie fatale familiale.

2. PrP : la cause des encéphalopathies spongiformes transmissibles

Pendant longtemps, aucun agent infectieux ne put être mis en avant. En 1938, il fut tout d'abord supposé que ces maladies étaient causées par un virus lent du fait de leurs longues incubations (Cuillé et Chelle, 1938; Sigurdsson, 1954). Cependant, cette hypothèse se perdra peu à peu par la suite. En effet, dans les années 40, le vétérinaire Gordon mis en place un protocole pour vacciner des animaux. Pour cela, il utilisait du formol pour inactiver un virus, trouvé dans le cerveau et la moelle épinière d'animaux infectés, afin de s'en servir comme vaccin (Gordon, 1946). Toutefois, ce protocole ne permit pas de vacciner les animaux contre l'agent infectieux causant la tremblante du mouton. De plus, durant les années 60, des tests

d'inactivation par ionisation, irradiation aux ultra-violets, chauffe, haute pression et autres composés qui inactiveraient les parasites, bactéries et virus, ne furent pas efficaces contre l'agent responsable de la tremblante du mouton (Pattison, 1965a; Alper et al., 1966; Prusiner, 1982). Tous ces résultats permirent la conclusion, d'une part que l'agent infectieux est extrêmement petit, et d'autre part qu'il est capable de se répliquer sans acides nucléiques (Alper et al., 1967), ce qui est contraire au dogme central de biologie (Crick, 1970). Ainsi en 1967, une hypothèse, allant à l'encontre du dogme médicale des maladies infectieuses, fut proposée : les encéphalopathies spongiformes transmissibles sont causées par une protéine (Alper et al., 1967; Griffith, 1967; Pattison et Jones, 1967; Bolton et al., 1982). Quinze ans plus tard, Stanley Prusiner poussera cette hypothèse encore plus loin, en parlant de " proteinaceous infectious particle " pour particule infectieuse protéique, retenue sous le terme de prion (Prusiner, 1982). Cette hypothèse fut renforcée par l'isolation d'une particule, infectieuse et protéique, provenant d'animaux morts (Bolton et al., 1982), et surtout, par l'inactivation de l'agent infectieux en utilisant des méthodes détruisant les protéines (Millson et Manning, 1979; Prusiner et al., 1980, 1981; McKinley et al., 1981; Prusiner, 1982; Prusiner et al., 1983). En 1985, Bruce Chesebro et Richard Race cherchèrent l'origine du message de l'agent infectieux. De manière surprenante, ils découvrirent que l'ARN messenger de l'agent, nommé PrP (pour protéine prion), est transcrit dans le cerveau des individus infectés, comme des individus sains (Chesebro et al., 1985). Ce résultat fut confirmé par la présence de la protéine chez les sujets malades comme sains (Oesch et al., 1985). Enfin, en 1993, l'hypothèse du prion fut, encore une fois, fortement renforcée par des résultats montrant qu'une souris, n'exprimant pas de PrP, ne pouvait pas développer de maladie (Büeler et al., 1993). Cette étude témoigne bien de la nécessité d'exprimer la

protéine pour développer la pathologie. Par la suite, de nombreuses études cherchèrent à comprendre en quoi la PrP^c, pour "cellulaire", est différente de la PrP^{sc}, pour "scrapie" (cause de la tremblante du mouton). Il put être mis en évidence que la PrP^c contient trois domaines en hélice- α , ainsi que deux petits domaines en brin- β , comptant pour 42 % et 3 % de sa structure respectivement (Riek et al., 1996; Hornemann et al., 1997; Liu et al., 1999). Au contraire, la PrP^{sc} contiendrait 30 % d'hélice- α et entre 45 % et 54 % de brin- β (Pan et al., 1993; Colby et Prusiner, 2011; Soto, 2012). Pour cela, ces pathologies sont décrites comme des maladies conformationnelles où, en adoptant une conformation différente de la structure native, une protéine devient pathogène.

B. Biochimie de l'agrégation

1. Le repliement des protéines

Comment expliquer qu'une protéine puisse changer de structure et adopter une autre conformation que sa structure native ? Pour comprendre cela, il faut d'abord expliquer comment les protéines se replient. Une première réponse nous vient du paradoxe de Levinthal (Levinthal, 1969). Levinthal questionne le fait qu'une protéine ne peut pas explorer toutes les conformations qui lui sont permises de façon aléatoire pour trouver sa conformation native. En effet, dans un tel scénario, le temps de repliement serait trop long. Or, les protéines adoptent leurs conformations en seulement quelques secondes voire millièmes de seconde. De plus, Anfinsen montra que, lorsque la ribonucléase A, un enzyme, est dénaturée par de l'urée, celle-ci perd sa structure et donc son activité. Cependant, dès lors que l'agent dénaturant est retiré du milieu (par dialyse), l'enzyme retrouve sa structure illustrée par son activité enzymatique (Anfinsen, 1973). Ceci, couplé au paradoxe de Levinthal, permet de

comprendre que l'information du repliement se trouve dans la séquence même de la protéine. Toutefois, il est important de noter que des facteurs extérieurs jouent aussi un rôle important dans ce repliement comme, par exemple, la température, la force ionique, le pH ou encore les chaperons moléculaires. Tous ces aspects vont pousser les protéines à adopter une conformation active plus ou moins stable (Fig. 2).

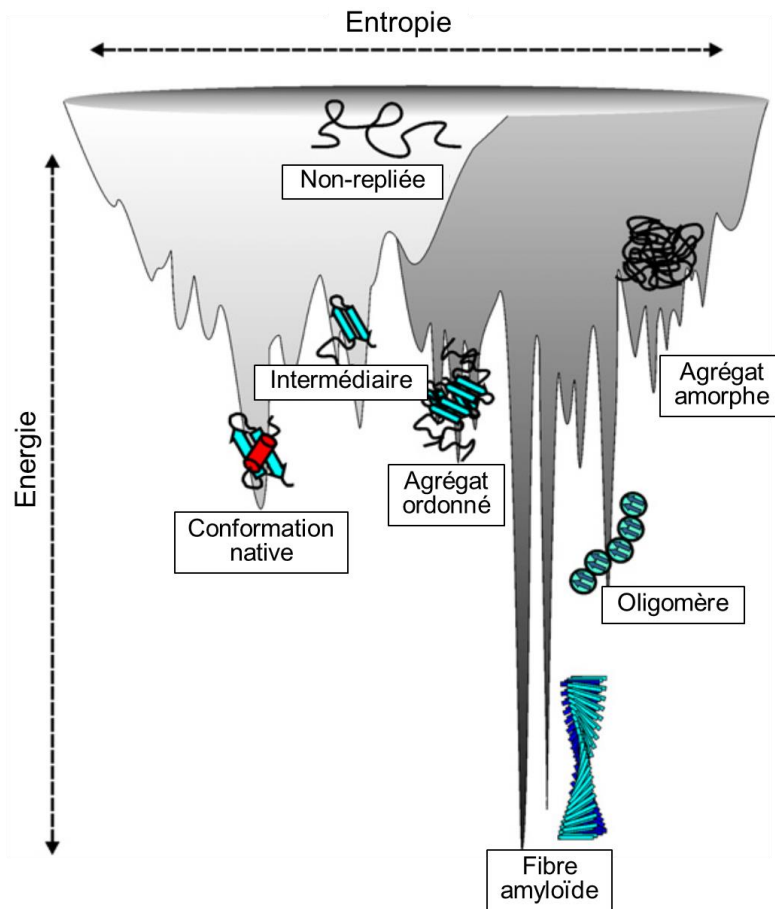


Figure 2 : Schéma des niveaux d'énergies des protéines lors de leurs repliements et agrégations. La rugosité de la ligne d'énergie illustre la multitude d'états conformationnels des protéines. Le schéma est divisé en deux parties. En gris clair sont illustrés les niveaux d'énergies dans la recherche d'une conformation stable en état monomérique, c'est-à-dire par des interactions intramoléculaires seules. En gris foncé sont illustrés les niveaux d'énergies des assemblages protéiques montrant la stabilité des fibres amyloïdes grâce aux liaisons intermoléculaires. Adaptée de (Jahn et Radford, 2008).

Néanmoins, même repliées, les protéines ne sont pas statiques et oscillent autour d'une ou plusieurs conformations (Fersht, 1999). Par exemple, dans le cas des protéinopathies, les protéines incriminées sont souvent partiellement non-repliées (ex : PrP), voir sans aucune structure définie (ex : α -synucléine), ce qui leurs permet d'explorer constamment de nombreuses conformations. De plus, le repliement peut survenir lors d'une liaison avec un partenaire. Par exemple, la protéine Tau, qui n'a pas de conformation définie dans le cytoplasme, adopte un repliement lorsqu'elle se lie à de la tubuline en solution ou à des microtubules (Cleveland et al., 1977; Kadavath et al., 2015; Li et al., 2015). Finalement, la fréquence de chacune des conformations d'une protéine est définie par de nombreux facteurs tels que : la stabilité des interactions intramoléculaires, les conditions physico-chimiques, ou encore la présence de ligands permettant des interactions intermoléculaires.

2. De la structure native à l'agrégat

Dans le cas où une protéine adopte une mauvaise conformation, pathologique ou non, celle-ci peut avoir plusieurs destins. Premièrement, cette structure peut disparaître d'elle-même. En effet, comme nous avons vu, si cette conformation n'est pas stable, ou stabilisée par des interactions, alors elle ne sera que transitoire. Deuxièmement, dans le cas où cette structure persiste, alors elle sera prise en charge par le système des chaperons moléculaires. Effectivement, ce système est défini comme l'ensemble des protéines cellulaires dont la fonction est de permettre le repliement de polypeptides (Ellis, 1987). Cette activité survient, entre autres, lors de la synthèse protéique, dans un contexte de stress cellulaire affectant la structure des protéines, ou encore pour aider les polypeptides à passer au travers des membranes

(Chang et al., 2007; Tang et al., 2007). Il est toutefois important de préciser que, dans le cas des encéphalopathies spongiformes transmissibles, les chaperons pourraient aussi accélérer l'agrégation de PrP (DeBurman et al., 1997; Stöckel et Hartl, 2001; Stroylova et al., 2014). Troisièmement, dans le cas où la protéine persisterait dans sa mauvaise conformation, le système de dégradation ubiquitine-protéasome (" **Ubiquitin-Proteasome System** " : UPS) peut la prendre en charge. Celui-ci peut être défini par deux groupes agissant conjointement. Le premier groupe est composé d'ubiquitines ligases qui vont marquer les protéines mal-repliées par une chaîne poly-ubiquitine. Le deuxième groupe, constitué du protéasome 26S, est composé du complexe 20S, ayant l'activité de dégradation des protéines, et d'un ou deux complexes régulateurs 19S, ayant une activité ATPase. Ainsi, les protéines mal-repliées seront marquées par une chaîne poly-ubiquitine, permettant l'adressage de celles-ci au protéasome pour être dégradées (Glickman et Ciechanover, 2002; Goldberg, 2003). Cependant, dans le cadre d'une encéphalopathie spongiforme transmissible, l'UPS fonctionne moins bien. En effet, dans ces pathologies, il a été démontré que PrP^{sc} est retrouvée ubiquitinée mais non dégradée (Kang et al., 2004). Ceci serait la conséquence de l'agrégation de PrP qui inhiberait le protéasome en interagissant avec celui-ci. De plus, il a été montré qu'avec le vieillissement, ces systèmes sont moins performants (Labbadia et Morimoto, 2014).

Cette diminution d'efficacité des systèmes de contrôle pourrait permettre l'accumulation de protéines mal-repliées, sous forme de fibres extrêmement stables, appelées fibres amyloïdes (Fig. 2 et 3) (Peelaerts et al., 2018). Les fibres amyloïdes sont définies par des propriétés bien précises : 1- elles s'allongent aux extrémités par l'incorporation de protéines monomériques ayant la bonne conformation ; 2- elles ont des propriétés spécifiques de marquage (par exemple : le rouge congo ou la

thioflavine T) ; 3- elles présentent une résistance à la protéolyse ; 4- elles ont une apparence fibrillaire en microscopie électronique ; 5- elles ont un fort contenu en feuillet β (Soto, 2003; Cobb et Surewicz, 2009).

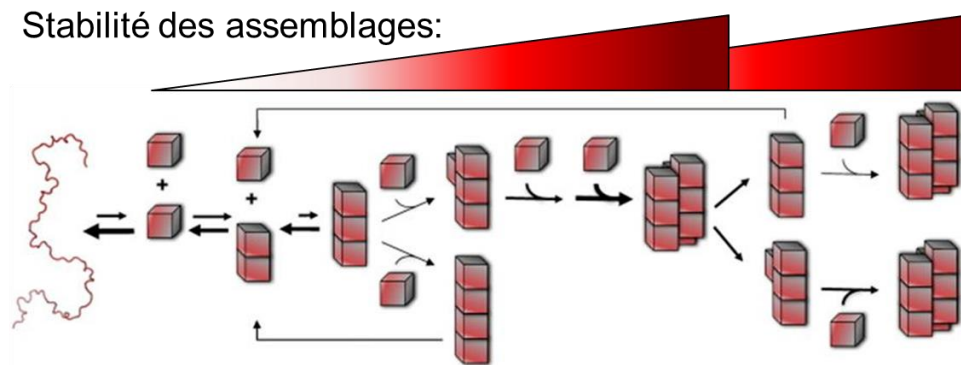


Figure 3 : Schéma de l'agrégation d'une protéine nativement non-repliée. Une protéine non-repliée (à gauche) peut, de manière réversible, acquérir une conformation pouvant s'agréger. Si cette structure entre en contact avec une autre protéine, de la même conformation, alors elles pourront s'assembler en oligomère dont la stabilité augmentera avec le nombre d'interactions (illustré par le gradient de blanc à rouge). Il est à noter que ce phénomène est réversible tant que des liaisons latérales ne stabilisent pas l'ensemble. La stabilité de ces assemblages dépendra de la constante d'association de la protéine, et de nombreux autres facteurs tels que la concentration en monomère, le taux de conversion sous forme agrégante, ou encore l'encombrement moléculaire. L'assemblage deviendra très stable une fois des liaisons latérales établies. Au-delà d'une certaine taille, les fibres peuvent se fragmenter en des assemblages plus ou moins stables qui, par augmentation du nombre d'extrémités pouvant s'allonger, vont permettre la propagation de la forme amyloïde. Adaptée de (Melki, 2018a).

Ainsi, lorsque PrP^c adopte sa forme pathogène, PrP^{sc}, celle-ci peut former des fibres amyloïdes qui s'accumulent dans le cerveau des patients atteints (Bolton et al., 1982; Prusiner et al., 1983; DeArmond et al., 1985; Caughey et Raymond, 1991; Borchelt et al., 1992; Gasset et al., 1993; Saborio et al., 2001; Deleault et al., 2005; Barria et al., 2009; Zhang et al., 2013).

C. La complexité de l'étude des maladies à prion

1. Le principe de souches

Durant le 20^{ème} siècle, de nombreuses formes d'encéphalopathies spongiformes transmissibles furent produites et décrites, par exemple chez la souris (Fraser, 1976; Dickinson et Fraser, 1977), chez le hamster (Chandler et Turefry, 1972; Kimberlin et Walker, 1977; Safar et al., 1998), ou encore chez le vison (Bessen et Marsh, 1992). Ainsi, les différentes formes de pathologies, appelées souches, ont pu être classées dans des groupes selon les paramètres suivants (Dickinson et Meikle, 1969; Fraser et Dickinson, 1973; Kimberlin et Walker, 1979; Bruce et al., 1989, 1991; Bruce, 1993) : 1- dans une espèce donnée, la concentration d'agent infectieux, dans le cerveau des animaux, est la même au moment du développement des symptômes, et ne dépend pas de l'âge, de la dose injectée, ou de la zone d'injection ; 2- le temps d'incubation, soit le temps entre l'injection et le développement des symptômes, est stable dans une lignée animale définie, et ne varie que par le site d'injection et la quantité injectée ; 3- les lésions retrouvées pour une souche sont toujours les mêmes et sont indépendantes du site d'injection et de l'espèce.

Cependant, comment expliquer les différences entre les souches ? Une première hypothèse fut que chaque souche est définie par l'interaction de matériels génétiques avec la forme pathologique de PrP (Weissmann, 1991). Cette hypothèse fut rapidement abandonnée par la suite, notamment par l'observation que des hautes doses d'ionisation, ou d'ultra-violet, n'influent pas sur la stabilité de la souche (Bruce, 1993). Une deuxième hypothèse est que les modifications post-traductionnelles de la PrP permettent de discriminer les souches. En effet, le ratio de PrP mono-glycosylé

sur di-glycosylé n'est pas le même entre la CJD classique et le nouveau variant de la CJD (Collinge et al., 1996; Hill et al., 1997). Toutefois, cette hypothèse n'est pas suffisante pour expliquer la large gamme des souches qui a été caractérisée (Somerville et Ritchie, 1990). Enfin, sachant que les séquences de PrP^c et de PrP^{sc} sont identiques, mais que leurs structures secondaires sont différentes, une troisième hypothèse serait que chaque souche est caractérisée par une structure distincte de la PrP^{sc} (Safar et al., 1993; Stahl et al., 1993). Cette hypothèse a pu être validée par l'observation, chez le vison ou le hamster, que les souches sont caractérisées par différentes conformations de PrP^{sc} (Bessen et Marsh, 1994; Safar et al., 1998). Par la suite, chez l'Homme, il put être démontré que dans l'insomnie fatale familiale PrP^{sc} a une structure différente que dans la CJD (Telling et al., 1996). De même, le nouveau variant de la CJD (Will et al., 1996) a été caractérisé comme ayant une structure, différente de celle retrouvée dans une CJD sporadique, mais identique à l'encéphalopathie spongiforme bovine. Ceci permit d'ailleurs de conclure qu'il y a eu une transmission de la pathologie de la vache à l'Homme (Collinge et al., 1996; Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997). Par ailleurs, la stabilité de la structure des souches a aussi été mise en avant. En effet, au fil des passages d'animaux en animaux, la pathologie reste la même, témoignant d'une conservation de la souche (Bruce, 1993; Bessen et Marsh, 1994; Collinge et al., 1996; Telling et al., 1996; Bruce et al., 1997). Dans l'idée de confirmer que c'est bien la structure de la PrP^{sc} qui fait la souche, il a été démontré chez l'animal, avec différentes fibres amyloïdes synthétiques de PrP, que les temps d'incubations et les profils pathologiques ne sont pas les mêmes selon la structure des assemblages (Legname et al., 2004, 2005; Colby et al., 2009).

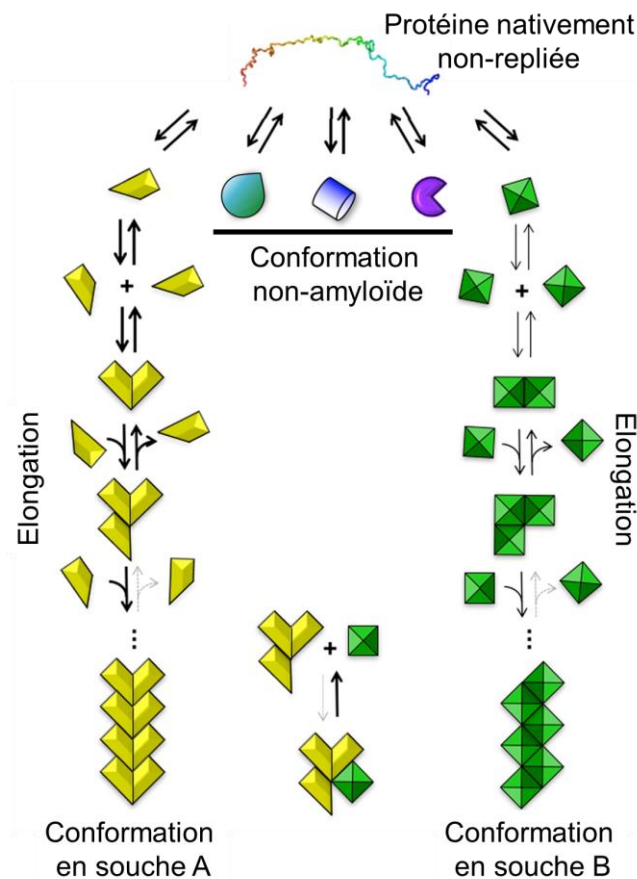


Figure 4 : Illustration du phénomène de souches. Dans la multitude de structure que peut adopter une protéine (jaune, turquoise, bleu, violet, ou vert), seules certaines de ces conformations ont la capacité de former des fibres amyloïdes. Par exemple, ici, les conformations turquoise, bleue et violette se feront et se déferont sans formation de fibres. Cependant, lorsque la protéine adoptera la structure jaune, ou verte, celle-ci pourra former des fibres amyloïdes. Pour cela, il faudra que la protéine interagisse avec d'autres monomères, ayant la même structure, afin de s'allonger. Ainsi, à partir d'une protéine monomérique, différentes fibres amyloïdes, ayant des caractéristiques structurales distinctes, pourront être obtenues. La capacité d'assemblages aux extrémités des fibres dépend de la conformation compatible ou non des monomères. Il n'est pas possible d'incorporer des monomères aux structures incompatibles. Cela explique l'homogénéité structurale des amyloïdes. Adaptée de (Brundin et Melki, 2017)

Finalement, il fut suggéré que l'information pathologique est présente dans la fibre via la structure des monomères (Fig. 4). Cette information est conservée car,

lorsqu'une protéine est incorporée dans l'assemblage amyloïde, celle-ci possède la même conformation que celle présente dans la fibre (Bessen et al., 1995; Legname et al., 2004).

2. Le phénomène de barrière d'espèces

Dans la recherche, pour comprendre le phénomène de souches, une autre caractéristique du prion fut mise en avant : la barrière d'espèces (Pattison, 1965b). Ainsi, Zlotnik et Rennie (Zlotnik et Rennie, 1965) mirent en avant que le temps d'incubation d'une souche, provenant de chèvres ou de moutons infectés, décroît au fil des passages chez la souris. Au contraire, une souche stable chez la souris verra son temps d'incubation augmenter si, avant réinjection chez la souris, il y a eu passage chez la chèvre ou le hamster. Par la suite, il fut démontré que cette adaptation de la souche va, au fil des passages chez une même espèce, faire baisser le temps d'incubation jusqu'à ce que celui-ci se stabilise (Kimberlin et Walker, 1977), tout en augmentant le temps d'incubation chez l'hôte d'origine (Kimberlin et Walker, 1978). L'explication de ce phénomène peut venir des différences dans la séquence de PrP entre les espèces. En effet, si une souris possède le gène codant la PrP de hamster, alors le temps d'incubation d'une souche provenant d'un hamster sera réduit proportionnellement à la quantité de PrP d'hamster exprimée, dès le premier passage (Carlson et al., 1989; Scott et al., 1989; Prusiner et al., 1990). De même, au sein d'une espèce, des mutations ponctuelles dans la séquence de la PrP vont aussi faire varier le temps d'incubation d'une souche (Lowenstein et al., 1990). Finalement, il a été conclu que le temps d'incubation dépend de la souche, de la barrière d'espèces et du génotype de l'individu (Hill et al., 1997).

Depuis la découverte que des maladies peuvent être causées par le mauvais repliement d'une protéine, de nombreuses autres pathologies ont été décrites comme étant des protéinopathies (Tab. 1). Celles-ci sont toutes liées à l'agrégation d'une ou plusieurs protéines, et peuvent présenter des mécanismes similaires à ceux des encéphalopathies spongiformes transmissibles. Dans le cadre de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé au groupe des maladies parkinsoniennes regroupant la maladie de Parkinson, les démences à corps de Lewy (DLB) et l'atrophie multi-systématisée (MSA).

Tableau 1 : Principales protéinopathies connues et leurs protéines associées.

Protéinopathies	Principales protéines
Neurodégénératives	
Ataxie spinocérébrale 3	ataxin 3 (<i>polyQ</i>)
Démences familiales Anglaises et Danoises	fragments protéiques codés par le gène BRI
Encéphalopathies Spongiformes	PrP (entier ou fragments)
Maladie d'Alzheimer	peptide A β (1-40, 1-42) et Tau
Maladie de Huntington	huntingtin (<i>polyQ</i>)
Maladie de Kennedy	récepteur androgène (<i>polyQ</i>)
Maladie de Parkinson	α -synucléine
Polyneuropathie familiale amyloïde	transthyrétine (TTR)
Sclérose amyotrophique latérale	SOD1 ou TDP-43
Non-neuropathiques – localisées	
Amylose liée à l'hémodialyse	β_2 -microglobuline
Cataracte	$\alpha\beta$ -crystalline
Diabète de type II	amyline
Non-neuropathiques – systémiques	
Amylose AA	fragments de protéine sérique amyloïde A
Amylose AL	chaîne légère d'immunoglobuline
Amylose systémique sénile	transthyrétine (TTR)

II. Les maladies parkinsoniennes

A. La maladie de Parkinson

1. Présentation

En 1817, dans " An essay of the shaking palsy ", James Parkinson décrit des symptômes de patients avec des troubles moteurs sans atteinte intellectuelle (Parkinson, 1817) :

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

Plus de cinquante ans plus tard, Jean-Martin Charcot donna à ce trouble le nom de maladie de Parkinson (Charcot, 1872). Depuis, la maladie de Parkinson est décrite comme une maladie liée à l'âge. En effet, l'âge moyen des patients lors du diagnostic est de 60 ans, avec une espérance de vie de douze à quinze ans. Il s'agit de la deuxième maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer, avec une prévalence, en France, de 150 000 et une incidence de 10 à 18 pour 100 000 personnes par an (Van Den Eeden et al., 2003), avec un pic d'incidence à 1 903 pour 100 000 personnes par an chez les personnes ayant 80 ans ou plus (Pringsheim et al., 2014). Enfin, un doublement du nombre de cas est attendu d'ici 2030 (Dorsey et al., 2007).

2. Les symptômes et le diagnostic

Aujourd'hui, le diagnostic est basé sur un ensemble de symptômes moteurs rassemblé sous l'acronyme TRAP pour : - **T**remblement au repos (le pouce doit trembler lorsque la main est posée sur le genou, mais il peut y avoir des tremblements de la main, du bras, des pieds, des lèvres ou du menton) ; - **R**igidité (en faisant tourner lentement le poignet ou le coude du patient il doit y avoir une résistance, souvent asymétrique) ; - **A**kinésie ou bradykinésie (les patients marchent lentement, avec une faible amplitude du balancement des bras et une hésitation dans l'initiation de la marche) ; - **I**nstabilité Posturale (besoin de se tenir à quelqu'un ou quelque chose pour se lever et/ou marcher ; survient plus tardivement dans la maladie) (Fernandez, 2015). Ainsi, pour parler de parkinsonisme, il faut avoir au moins deux de ces quatre symptômes, sachant que les tremblements et la rigidité ont plus d'importance pour le diagnostic.

Il existe de nombreuses combinaisons de troubles moteurs qui ont conduit à la création de différents sous-types (Marras et Lang, 2013). Les deux principaux groupes sont la maladie de Parkinson avec tremblements dominants (généralement absence des autres symptômes moteurs) et la maladie de Parkinson sans tremblements (surtout rigidité et instabilité posturale) (Kalia et Lang, 2015). De plus, les patients atteints de la maladie de Parkinson doivent répondre à la dopamine synthétique ou L-DOPA (principal traitement). En effet, dans le cas de la maladie de Parkinson, l'administration de L-DOPA va inhiber les symptômes moteurs pendant une période appelée la " lune de miel ", avant que le patient soit atteint de dyskinésie (Ehringer et Hornykiewicz, 1960; Birkmayer et Hornykiewicz, 1998).

De nombreux autres symptômes ont été décrits comme arrivant en phase prodromique voire préclinique de la maladie. Les plus communs sont l'anosmie / hyposmie, la constipation, la dépression, la fatigue et des troubles du comportement du sommeil paradoxal. D'autres symptômes moins fréquents peuvent être décrits comme l'anxiété, la micrographie, la modification de la parole (hypophonie, bégaiement, etc...), la posture voutée ou encore des troubles érectiles (Wirdefeldt et al., 2011; Postuma et al., 2012; Bonnet et al., 2012). Certains de ces symptômes pourraient servir de marqueurs afin de détecter la maladie de Parkinson avant l'apparition des symptômes moteurs. Par exemple, 30 % des patients avec des troubles du comportement du sommeil paradoxal ont développé une maladie parkinsonienne trois ans plus tard, et cela monte à 66 % sept ans et demi plus tard (Dehay et al., 2015). D'autres symptômes peuvent survenir plus tard tels que des troubles cognitifs, des hallucinations, des troubles du système autonome (incontinence urinaire, hypotension orthostatique...) ou encore des démences (Hely et al., 2005, 2008).

Malgré la large gamme de symptômes qui permet de décrire la maladie (Jankovic, 2008), le diagnostic de la maladie de Parkinson reste compliqué. Toutefois, il peut être confirmé après autopsie. En effet, dès le début du 20^{ème} siècle, un lien entre maladie de Parkinson et présence de dépôts protéiques dans certaines régions du cerveau fut établi. Ces dépôts sont appelés corps de Lewy (ou " **Lewy Bodies** " : LB) (Lewy, 1912; Tretiakoff, 1919). Le marqueur pour le diagnostic de la maladie de Parkinson devient la dépigmentation de la substance noire associée à la présence de LB.

3. La théorie de Braak

Même si la maladie de Parkinson est caractérisée par des inclusions dans les neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNpc), des LB sont trouvés dans de nombreuses autres régions du cerveau, ainsi que dans les neurones du système digestif (Kupsky et al., 1987; Wakabayashi et al., 1988; Forno, 1996; Lebouvier et al., 2008). Durant le début des années 2000, Heiko Braak mit en avant le fait que cette maladie progresse selon un profil caractéristique, qu'il put découper en 6 stades. La pathologie pourrait débiter au niveau du bulbe olfactif, du tronc cérébral, ou encore du système nerveux digestif, avant de se propager dans le cerveau (Fig. 5) (Braak et al., 2003a, 2003b, 2006; Hawkes et al., 2007; Braak et Del Tredici, 2008, 2009; Dickson, 2012). Par la suite, de nombreuses équipes mirent en avant un lien entre les stades de Braak, la zone affectée et les symptômes du patient (Tab. 2). Par exemple, le stade 1 correspond aux troubles digestifs (Pfeiffer, 2003), ou le stade 3 correspond à l'apparition des symptômes moteurs, lorsque 50 à 60 % des neurones dopaminergiques de la SNpc sont morts (Lee et al., 1994; Thobois et al., 2005; Dickson et al., 2009; Schapira, 2009; Bonnet et al., 2012; Kordower et al., 2013).

Bien qu'étant largement acceptés, notamment par la démonstration, chez le rat, que des agrégats peuvent effectivement passer des neurones du système digestif au cerveau (Phillips et al., 2008; Holmqvist et al., 2014), certains groupes remettent en cause les stades de Braak. En premier lieu, il est rapporté que les stades de Braak ne permettent de classifier que jusqu'à 50 % des patients avec des dépôts protéiques (Jellinger, 2008; Zaccai et al., 2008; Beach et al., 2009).

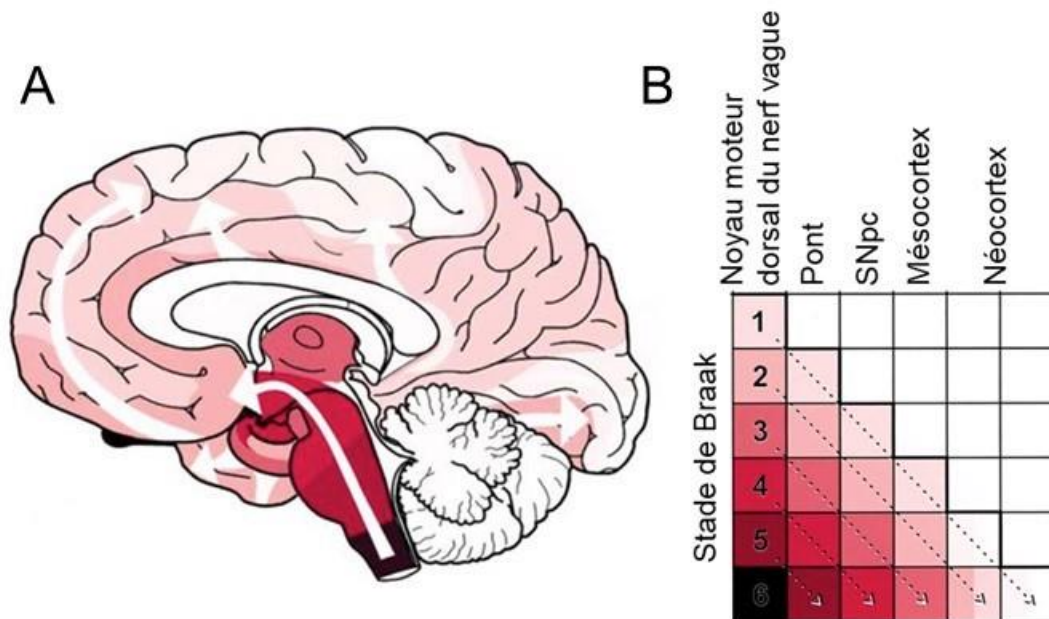


Figure 5 : Représentations des stades de Braak. A : Schéma de la progression de la maladie de Parkinson dans le cerveau. Les différents stades de Braak sont colorés de rose clair à noir. Plus la couleur est foncée plus la zone est affectée précocement dans la maladie. Ce schéma montre, selon l'hypothèse de Braak, la diffusion progressive des dépôts protéiques dans le cerveau au cours de la maladie. B : Zones du cerveau affectées selon les stades de Braak. Les différents stades de Braak sont annotés de 1 à 6. Pour un stade, plus la couleur est foncée plus la zone est affectée précocement. Adaptée de (Braak et al., 2003b).

Tableau 2 : Relation entre les stades de Braak, la localisation des dépôts et les symptômes du patient.

Stade	Régions affectées	Symptômes
1	Bulbe olfactif Système nerveux entérique Noyau moteur dorsal du nerf vague	Anosmie/Hyposmie Constipation
2	Pont	Dépression
3	Mésencéphale (dont la SNpc)	Symptômes moteurs
4	Allocortex et mésocortex	Démences
5	Néocortex	Symptômes non-moteurs tardifs
6		

De plus, dans la classification de Braak, tous les patients présentent des dépôts dans le noyau moteur dorsal du nerf vague. Ceci peut être un biais dans l'analyse puisque certains cas sont rapportés comme n'ayant pas de dépôt dans cette région (Kalaitzakis et al., 2008; Kingsbury et al., 2010; Visanji et al., 2013). Par ailleurs, l'hypothèse d'une progression depuis le système digestif au cerveau provient surtout de l'observation d'un gradient de phosphorylation des dépôts (Beach et al., 2010). Cependant, il a été rapporté que 65 % des patients ont autant de dépôts dans la SNpc que dans le noyau moteur dorsal du nerf vague (Jellinger, 2008). Enfin, même chez des patients sains, des dépôts dans le système nerveux entérique sont retrouvés (Kupsky et al., 1987). Finalement, il a été rapporté que les stades de Braak correspondraient surtout avec les maladies de Parkinson ayant eu un début précoce, mais beaucoup moins avec les cas déclarés tardivement (Halliday et al., 2008).

B. Les démences à corps de Lewy

1. Présentation

Dans certains cas, s'il n'y a pas ou peu de réponse à la L-DOPA, et que certains symptômes arrivent de manière trop précoce, le diagnostic écartera la maladie de Parkinson pour une autre maladie neurodégénérative (Tab. 3) (Fernandez, 2015). C'est ainsi qu'en 1961, Okazaki et ses collègues firent la description des démences à corps de Lewy (" **Dementia with Lewy Bodies** " : DLB) (Okazaki et al., 1961). Ils décrivent deux cas clinico-pathologiques qui présentaient une démence progressive, avec troubles moteurs, et associés à des inclusions de type LB dans les neurones corticaux. Cependant, cette maladie ne sera vraiment reconnue que trente ans plus tard, notamment après la publication du guide de diagnostic pour les DLB (McKeith et al., 1996). Aujourd'hui, les DLB sont connues

comme la deuxième cause de démences après la maladie d'Alzheimer (soit 25 % des démences totales). Les DLB sont aussi des maladies liées à l'âge avec un âge moyen lors du diagnostic de 70 ans et une espérance de vie de cinq ans (McCann et al., 2014). Les DLB ont une prévalence de 0,7 % à 65 ans avec une incidence de 3,5 /100 000 personnes par an (Mayo et Bordelon, 2014).

Tableau 3 : Comparaison des principales caractéristiques des maladies parkinsoniennes. Adapté de (McCann et al., 2014).

Caractéristiques	Maladie de Parkinson	DLB	MSA
Age au diagnostic (années)	≈60	≈70	≈60
Espérance de vie (années)	≈12	≈5	≈6-9
Symptômes moteurs	Oui	Pas obligatoire	Oui
Réponse à la L-DOPA	Oui	Variable	Non
Symptômes non-moteur			
Système autonome	Tardif	Tardif	Précoce
Hallucinations	Tardives	Précoces	Non
Hyposmie / Anosmie	Précoce	Précoce	Non
Démences	Tardives	Précoces	Variables
Principales cellules affectées	Neurones	Neurones	Oligodendrocytes

2. Les symptômes et le diagnostic

Comme pour la maladie de Parkinson, les DLB sont caractérisées par des troubles moteurs parkinsoniens. Cependant, ceux-ci sont généralement bilatéraux et symétriques (McKeith et al., 2005). De plus, les DLB sont surtout caractérisées par des démences, des déficits de l'attention et des troubles intellectuels qui surviennent bien plus rapidement que chez un patient atteint de maladie de Parkinson. Enfin, avec l'avancée de la maladie, les patients sont souvent atteints d'anomie / aphasie, d'apraxie ou encore de troubles de la mémoire (Mayo et Bordelon, 2014).

Finalement, le diagnostic se basera sur une triade de symptômes qui sont les troubles cognitifs, les hallucinations visuelles et les troubles moteurs de la TRAP (McKeith, 2006). Par ailleurs, le diagnostic peut être facilité dans le cas où le patient serait victime de chutes répétées, de pertes de conscience, de délires, d'hallucinations non-visuelles ou encore de dépression. Il est à noter que, comme pour la maladie de Parkinson, les troubles du comportement du sommeil paradoxal sont un signe avant-coureur de la maladie, car ils peuvent survenir jusqu'à quelques années avant les troubles moteurs et cognitifs.

Comme pour la maladie de Parkinson, le diagnostic définitif est très compliqué du fait de la variation des symptômes possibles (Papka et al., 1998). Plusieurs groupes de DLB ont été créés dont les plus communs sont les DLB pures, la maladie de Parkinson avec démences, ou encore les DLB associées à la maladie d'Alzheimer. Ces groupes ne sont pas admis par tous, en effet les différences sont minces. Par exemple, pour déclarer une DLB pure, les troubles doivent être plus exécutifs que mémoriels ; dans le cas d'une maladie de Parkinson avec démences, le patient doit avoir des démences dans l'année qui suit le diagnostic ; dans un mélange DLB et maladie d'Alzheimer, le déclin doit être plus rapide avec une durée de maladie plus courte (McCann et al., 2014). Par ailleurs, la confusion entre maladie d'Alzheimer et DLB est très fréquente.

3. L'histopathologie

Comme pour la maladie de Parkinson, le diagnostic peut être confirmé post-mortem puisque, dans le cas des DLB, les LB sont plus diffus, plus abondants, et localisés principalement dans les régions corticales et sous-corticales du cerveau (Fig. 6) (Kosaka, 1978). En plus de ces régions, il a été découvert que les LB sont

aussi retrouvés dans la substance noire, ainsi que dans le système limbique dont l'amygdale et l'hippocampe (Kosaka, 1990; Spillantini et Goedert, 2000).

Contrairement à la maladie de Parkinson, il n'a pas encore été montré de progression typique dans le cas des DLB. Alors que certains supposent que la maladie commencerait dans le mésencéphale avant de se propager au néocortex (McCann et al., 2014), d'autres font l'hypothèse inverse et avancent que la maladie commencerait dans les régions corticales avant de se propager jusque dans le mésencéphale (Kosaka, 2014).

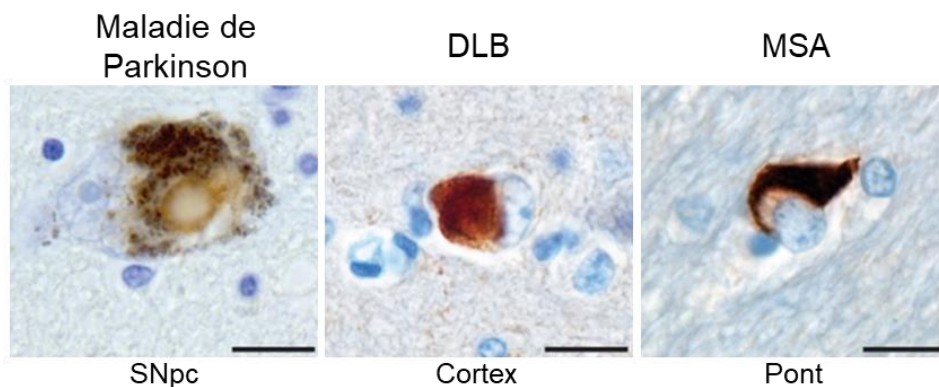


Figure 6 : Marquage histologique des dépôts selon la maladie parkinsonienne. Le marquage a été réalisé par un anticorps anti- α -synucléine. La barre noire sur les images représente l'échelle = 25 μ m. Adaptée de (McCann et al., 2014).

C. L'atrophie multi-systématisée

1. Présentation

En 1960, Milton Shy et Glenn Drager décrivent le cas de deux patients atteints d'hypotension orthostatique, de perturbation du système autonome et avec des troubles moteurs ressemblant à ceux présents dans la maladie de Parkinson (Shy et Drager, 1960). En 1969, ces symptômes, connus sous le nom de syndrome

Shy-Drager, furent rassemblés avec l'atrophie olivo-ponto-cérébelleuse et la dégénérescence striatonigrale sous un terme unique : l'atrophie multi-systématisée (" **M**ultiple **S**ystem **A**trophia " : MSA) (Graham et Oppenheimer, 1969).

Aujourd'hui, la MSA est définie comme une maladie liée à l'âge, avec un âge moyen lors du diagnostic de 60 ans et une espérance de vie entre celle des patients atteints de DLB et celle des patients atteints de maladie de Parkinson, soit entre six et neuf ans (Tab. 3) (McCann et al., 2014). La MSA possède une prévalence entre 1,9 et 4,9 / 100 000 (Chiò et al., 1998; Tison et al., 2000), augmentant à 7,8 /100 000 chez les plus de 40 ans (Schrag et al., 1999). La MSA présente une incidence entre 0,1 et 3 / 100 000 personnes par an (Bower et al., 1997) et augmente avec l'âge (12 / 100 000 personnes par an chez les plus de 70 ans (Chrysostome et al., 2004)).

2. Les symptômes et le diagnostic

Cette maladie, qui ne répond pas à la L-DOPA, est séparée en deux groupes (Gilman et al., 2008). Le premier groupe, majoritairement présent sur le continent asiatique, est appelé MSA-C pour MSA cérébelleuse. Il se caractérise par une ataxie de la posture et des membres, ainsi que des difficultés à parler. Le deuxième groupe, majoritairement présent dans les pays occidentaux, est appelé MSA-P pour MSA avec parkinsonisme. Il se caractérise par des symptômes moteurs de la TRAP qui sont généralement symétriques et une espérance de vie plus courte. Dans les deux groupes, la grande majorité des patients (75 à 95 %) auront des troubles du système autonome, notamment le système gastro-intestinal, cardiovasculaire et urogénital. A des stades plus avancés, les patients seront atteints de dysphonie, dysphagie et dystonie. Enfin, comme pour la maladie de Parkinson et les DLB, la MSA est caractérisée par une phase prodromale où le patient pourra être atteint de troubles

du comportement du sommeil paradoxal, mais aussi de troubles urogénitaux (dont des problèmes sexuels), de dépression et d'anxiété, tout ceci pouvant survenir des mois voire des années avant le diagnostic (McCann et al., 2014; Jellinger, 2018).

Il est important de préciser que, contrairement à la maladie de Parkinson et aux DLB, les patients atteints de MSA ne présentent ni d'atteinte olfactive, ni d'hallucination. Concernant les démences, il s'agit d'un symptôme controversé puisque certains estiment qu'il n'y en a pas (Gilman et al., 1999, 2008), alors que d'autres estiment qu'entre 10 et 30 % des patients atteints de MSA développeraient des démences (Kitayama et al., 2009; Brown et al., 2010; Kim et al., 2013; Stankovic et al., 2014).

3. L'histopathologie

Comme pour la maladie de Parkinson et les DLB, la MSA peut être confirmée de manière post-mortem (Koga et al., 2015). La principale marque de la MSA est la présence d'inclusions protéiques dans le cytoplasme des cellules gliales du système nerveux (Fig. 6), dont les plus affectées sont les oligodendrocytes (Papp et al., 1989; Trojanowski et al., 2007). Toutefois, des inclusions dans les neurones sont aussi détectables (McCann et al., 2014). De même, dans des stades très avancés de la maladie de Parkinson, des inclusions sont détectées dans certaines cellules gliales du cerveau, dont les astrocytes (Arai et al., 1999; Braak et al., 2007).

Dans le cadre d'une MSA, les principales régions affectées du cerveau sont le cervelet et le pont (surtout pour MSA-C), la SNpc et le striatum (surtout MSA-P), ainsi que la moelle épinière et le système nerveux entérique (Benarroch et al., 2005, 2006; Pouclet et al., 2012; McCann et al., 2014; Jellinger, 2018). Comme pour les DLB, et

contrairement à la maladie de Parkinson, il n'y a pas de profil d'évolution typique qui a pu être décrit (Fujishiro et al., 2008). Cependant, il a été tenté de découper la maladie en 3 stades selon le type MSA-C ou MSA-P (Tab. 4).

Tableau 4 : Stades proposés pour l'évolution de l'atrophie multi-systématisée. Le tableau énumère, dans les principales régions affectées du cerveau, le niveau de pathologie selon le type de MSA. - : pas de mort cellulaire ni de dépôt ; + : présence de dépôts ; ++ : présence de dépôts associés à de la mort cellulaire. Adapté de (Jellinger et al., 2005; Brettschneider et al., 2017).

Stades		I	II	III
MSA-C	Cervelet	+	++	++
	Pont et Noyau de l'olive	-	+	++
	SNpc	Variable		
MSA-P	SNpc	++	++	++
	Putamen	+	++	++
	Noyau caudé et Globus pallidus	-	+	++

III. Des maladies parkinsoniennes aux synucléinopathies

A. Découverte de l' α -synucléine

1. L' α -synucléine dans les maladies parkinsoniennes

Les maladies parkinsoniennes sont sporadiques dans 80 à 90 % des cas (Prusiner, 2012, 2013). Le reste des cas peut être expliqué par des facteurs génétiques. La forme héréditaire dominante la plus fréquente correspond à une mutation dans le gène codant pour la kinase LRRK2 (" **L**eucine-**R**ich-**R**epeat-**K**inase **2** "). La forme familiale récessive la plus fréquente correspond à une mutation

dans le gène codant la protéine Parkin qui est une ubiquitine ligase (Corti et al., 2011). De nombreuses autres formes génétiques ont été identifiées, telles que des mutations dans le gène de la kinase mitochondriale Pink1, de UCH-L1 (" **U**biqUitine **C**arboxy-ter **H**ydrolase **L1** " ; un enzyme désubiquitinant) (Leroy et al., 1998) ou encore dans le gène codant pour l' α -synucléine. Il est intéressant de remarquer que ces protéines, qui induisent une forme familiale de maladie de Parkinson lorsqu'elles sont mutées, sont retrouvées dans les corps de Lewy tel que parkin, UCH-L1 ou encore l' α -synucléine (Baba et al., 1998; McNaught et al., 2001).

Rapidement, l' α -synucléine a été désignée comme étant la cause des maladies parkinsoniennes. Ceci vint de trois observations principales. Premièrement, il a été démontré par analyse génétique que, chez une famille originaire de la ville de Contursi en Italie, et ayant une forme familiale précoce de la maladie de Parkinson, la maladie ségrégait bien avec la région q21 du chromosome 4. Or, cette région contient, entre autres, le gène SNCA codant pour l' α -synucléine (Golbe et al., 1990; Spillantini et al., 1995; Polymeropoulos et al., 1996). Deuxièmement, il a été décrit qu'une duplication du gène SNCA conduit à une forme héréditaire de la maladie de Parkinson avec un développement similaire au cas sporadique (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibáñez et al., 2004). De plus, une triplication du gène SNCA conduira à une forme précoce et sévère de maladie de Parkinson (Singleton et al., 2003). Troisièmement, durant les années 60, il fut découvert que les dépôts protéiques des maladies parkinsoniennes sont formés de filaments (Duffy et Tennyson, 1965). En 1998, il a été établi que ces filaments sont des fibres d' α -synucléine (Goedert et al., 1998; Spillantini et al., 1998a, 1998b).

Effectivement, *in vitro*, il a été montré que l' α -synucléine peut former des assemblages amyloïdes qui s'allongent par incorporation de la protéine (Fig. 7). Dès lors, les maladies parkinsoniennes ont été rassemblées sous un nouveau terme : les synucléinopathies (Spillantini et al., 1997; Goedert et Spillantini, 1998; Spillantini et Goedert, 2000; Goedert et al., 2017).

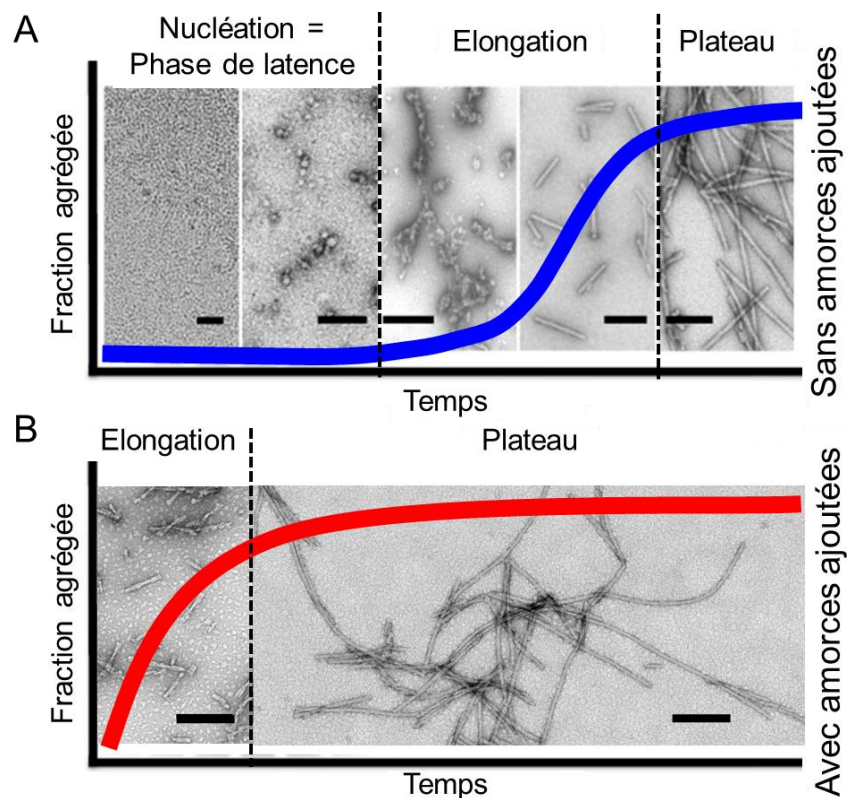


Figure 7 : Suivi d'agrégation illustré par des images de microscopie électronique. A : Agrégation de novo de l' α -synucléine. Trois phases peuvent être décrites. En premier, la phase de latence correspond au temps nécessaire pour que des assemblages se forment et deviennent stables. En second, la phase d'élongation, durant laquelle les assemblages incorporent de la protéine monomérique pour former de longs filaments. En dernier, le plateau qui correspond à la phase stationnaire où les protéines sont en équilibre entre forme monomérique et forme assemblée. B : Cinétique d'agrégation de l' α -synucléine en présence de fibres préformées. Dans cette situation, la phase de latence est abolie. Les phases d'élongation et du plateau restent inchangées. La barre noire sur les images de microscopie électronique représente l'échelle = 200 nm. Adaptée de (Melki, 2018a).

2. Historique des synucléines

La première description des synucléines a été faite en 1988. A ce moment, la synucléine était décrite comme une protéine présente à la fois dans la partie présynaptique des neurones, et au niveau des noyaux des cellules d'où le nom de synucléine (contraction de synapse et nucleus soit noyau) (Maroteaux et al., 1988). Bien que la localisation nucléaire ait été invalidée par la suite (Iwai et al., 1995), le nom est resté. Cinq ans plus tard, une équipe identifia une protéine présente dans les plaques d'Alzheimer, mais n'étant pas la protéine β -amyloïde. Cette protéine fut appelée le composant non-amyloïde β (" **Non-Amyloïde- β Component** " : NAC) (Uéda et al., 1993). L'année suivante, deux formes homologues de la synucléine furent caractérisées : la première, composée de 140 acides aminés, identique au précurseur du NAC, et la deuxième, composée de 134 acides aminés, homologue de la phosphoneuroprotéine-14 du rat. Elles furent nommées α -synucléine et β -synucléine respectivement (Jakes et al., 1994). Un troisième membre de la famille des synucléines sera décrit en 1997, impliqué dans le cancer du sein, et appelé γ -synucléine (Ji et al., 1997). La γ -synucléine, composée de 127 acides aminés, possède 55 % d'homologie avec l' α -synucléine (Goedert et al., 1998). Seule l' α -synucléine a été décrite comme étant impliquée dans les synucléinopathies. Il est à noter que l' α -synucléine est une protéine exprimée de manière constitutive dans l'organisme, à l'exception du foie, avec une expression importante dans le cerveau (Uéda et al., 1993; Jakes et al., 1994). En effet, l' α -synucléine et la β -synucléine représentent 0,1 à 0,2 % des protéines totales du cerveau (Spillantini et Goedert, 2000).

B. Description de l' α -synucléine

1. La séquence de l' α -synucléine

La séquence de l' α -synucléine peut être divisée en trois régions (Fig. 8A).

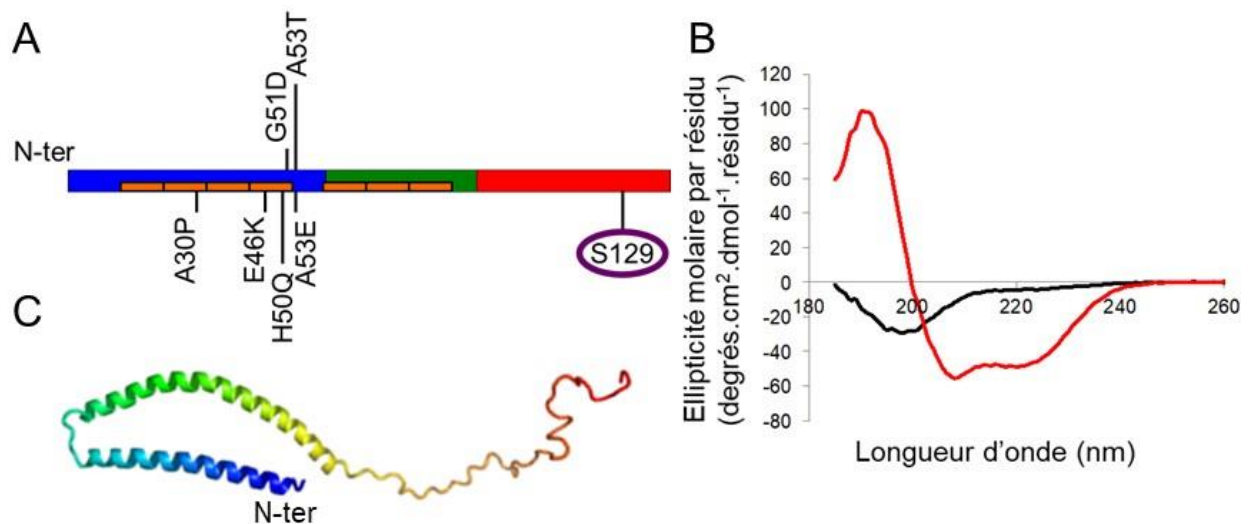


Figure 8 : Illustrations des principales caractéristiques de séquence et de structure de l' α -synucléine. A : Représentation schématique des domaines de l' α -synucléine. En bleu, vert et rouge sont représentés le domaine N-terminal, la partie centrale hydrophobe et le domaine C-terminal chargé négativement respectivement. Les encadrés orange indiquent la localisation de chacune des 7 répétitions imparfaites d'acides aminés dans l' α -synucléine. Les 6 mutations liées à des formes familiales de synucléinopathies sont annotées. Enfin, le site de la principale phosphorylation de l' α -synucléine est entouré en violet. B : Spectres de dichroïsme circulaire de l' α -synucléine en absence (noir) ou présence (rouge) de vésicules lipidiques (DOPG). Les résultats indiquent que l' α -synucléine passe d'une structure non-repliée à une structure en hélice α en présence de membranes. C : Modélisation de la structure de l' α -synucléine lorsqu'elle s'insère dans des micelles. La partie N-terminale adopte une structure en hélice α , alors que la partie C-terminale reste non-repliée. 1XQ8 sur PDB (Ulmer et al., 2005).

La région N-terminale, comprenant les acides aminés 1 à 60, contient une partie des sept répétitions imparfaites de six acides aminés KTKEGC. La région

centrale, comprenant les résidus 61 à 95, correspond à la région du NAC et est composée d'acides aminés hydrophobes. Enfin, la région C-terminale, comprenant les résidus 96 à 140, est chargée négativement.

L' α -synucléine est décrite comme ayant une structure naturellement non-repliée mais compacte afin de protéger la région du NAC (Weinreb et al., 1996; Giasson et al., 2001; Cox et al., 2014; Theillet et al., 2016). Elle possède des similarités de séquence avec une apolipoprotéine, lui permettant d'interagir avec les membranes (Varkey et al., 2010). Ainsi, en présence de lipides, les cent premiers résidus se structurent en hélice α pour former une épingle à cheveux liée à la membrane. La partie C-terminale reste libre et peut servir de lien avec des partenaires (Fig. 8) (Weinreb et al., 1996; Clayton et George, 1998; Davidson et al., 1998; Jensen et al., 1998; Perrin et al., 2000; Eliezer et al., 2001; Ulmer et al., 2005; Jao et al., 2008).

2. Le rôle de l' α -synucléine

La fonction de l' α -synucléine n'est toujours pas clairement définie. Cependant, il est fortement suggéré que l' α -synucléine serait impliquée dans le trafic vésiculaire au niveau des synapses. Cette fonction pourrait se faire par la propriété de l' α -synucléine à induire un amincissement et une courbure des membranes lorsqu'elle y est liée (Varkey et al., 2010; Braun et al., 2012; Mizuno et al., 2012; Braun et al., 2014; Shi et al., 2015). Toutefois, il n'est pas clair si l' α -synucléine agit sur l'endocytose ou l'exocytose. D'une part, certains résultats tendent à démontrer que l' α -synucléine agirait au niveau de l'exocytose des vésicules. En effet, l' α -synucléine peut favoriser l'assemblage des complexes SNARE (" Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor " ; complexe impliqué

dans la fusion des membranes des vésicules avec la synapse pour l'exocytose) via son domaine C-terminal, tout en regroupant les vésicules synaptiques (Burré et al., 2010; Garcia-Reitböck et al., 2010; Diao et al., 2013; Burré et al., 2014; Wang et al., 2014; Fusco et al., 2016). D'autre part, certains groupes suggèrent que l' α -synucléine agirait sur l'endocytose clathrine-dépendante au niveau des synapses, via son interaction avec la dynamine (Vargas et al., 2014). Enfin, dans un tout autre registre, certains groupes rapportent que l' α -synucléine agirait sur la mitochondrie soit en favorisant la fragmentation de celle-ci (Gitler et al., 2008; Kamp et al., 2010; Nakamura et al., 2011), soit en inhibant, par son domaine C-terminal, l'activité du canal VDAC (pour " **V**oltage-**D**eependent **A**nion **C**hannel ") (Lu et al., 2013; Flagmeier et al., 2016), soit en interagissant, par son domaine N-terminal, avec le canal ANT (pour " **A**denine **N**ucleotide **T**ranslocator ") (Shen et al., 2014) ou encore en inhibant l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Liu et al., 2009).

C. L' α -synucléine dans les synucléinopathies

Depuis que l' α -synucléine agrégée est définie comme le marqueur des synucléinopathies, de nombreuses équipes cherchent à comprendre comment cette protéine, normalement sans structure dans le cytoplasme, ou en hélices α au contact des membranes, peut s'agréger et être associée à la pathologie.

1. Epidémiologie des synucléinopathies

Des études épidémiologiques ont identifié des facteurs pouvant augmenter ou diminuer le risque de développer ces pathologies (Elbaz et al., 2002; Noyce et al., 2012; McKee et al., 2013; Kalia et Lang, 2015; Ascherio et Schwarzschild, 2016; Elbaz et al., 2016; Noyce et al., 2016; Killinger et al., 2018). Par exemple, les

facteurs identifiés comme réduisant les risques sont la caféine, l'alcool, le tabac, les médicaments anti-inflammatoires (non-stéroïdiens) ou inhibiteurs de canaux calciques, l'ablation de l'appendice, ou encore une activité sportive. A l'inverse, les facteurs identifiés comme aggravant les risques sont les pesticides, un traumatisme crânien, les médicaments bêtabloquants, les produits laitiers, la méthamphétamine ou encore les métaux lourds. Toutefois, il est important de préciser qu'il s'agit d'études épidémiologiques, de cohortes, qui montrent une corrélation entre maladies et facteurs de risque, mais que très peu de cibles moléculaires, liées à ces facteurs, ont été identifiées. A l'inverse, certains pesticides et toxines, tels que la roténone, le paraquat, ou le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine, généré lors de la mauvaise synthèse d'une drogue opioïde), sont décrits comme provoquant le développement de syndromes parkinsoniens par la destruction totale des neurones dopaminergiques. Ces composés sont d'ailleurs largement utilisés dans le cadre de modèles animaux de la maladie de Parkinson (Hantraye et al., 1993; Varastet et al., 1994; Pan-Montojo et al., 2010, 2012).

2. D'une forme saine à une forme pathologique

Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer l'origine de l'agrégation de l' α -synucléine. Premièrement, l'agrégation pourrait survenir à la suite d'un défaut mitochondrial. Ceci est compatible avec l'action des pesticides qui induisent la maladie de Parkinson en perturbant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Tanner et al., 2011; Furlong et al., 2015). Or, ce complexe est impliqué dans la formation d'espèces réactives de l'oxygène (" **Reactive Oxygen Species** " : ROS) (Murphy, 2009). Ainsi, l'action des pesticides, tout comme la forme mutante de la kinase mitochondriale Pink1 (qui est associée à des formes familiales

de la maladie de Parkinson), conduiraient à la surproduction de ROS (Cochemé et Murphy, 2008; Wang et al., 2011). Une seconde évidence de l'implication des ROS dans la pathologie est le rôle joué par DJ-1. Ce chaperon moléculaire est impliqué dans la réponse au stress oxydant. Ainsi, lorsqu'il est muté, il cause une forme récessive de maladie de Parkinson et, lorsqu'il est déplété, de la neurodégénération est observée (Meulener et al., 2006; Dave et al., 2014; Zaltieri et al., 2015). Pour résumer, les défauts de la mitochondrie provoqueraient une accumulation de ROS, ces derniers affecteraient l'intégrité des protéines et favoriseraient le développement de la pathologie. Ce mode d'action est aussi appuyé par le fait que les ROS faciliteraient l'agrégation de l' α -synucléine (Iljina et al., 2016).

Deuxièmement, une perte du contrôle de la protéostase pourrait conduire au développement des synucléinopathies. Les contrôles de la qualité des protéines cellulaires sont effectués par les chaperons moléculaires, associés aux voies de dégradation du protéasome et du lysosome. Par exemple, pour le chaperon moléculaire Hsp70, il a été observé que lorsqu'il est surexprimé, il y a une baisse de la mort cellulaire associée à une diminution de l'agrégation de l' α -synucléine (Zhou et al., 2004). De plus, des mutations dans des protéines impliquées dans la régulation de la dégradation par la voie ubiquitine /protéasome, telles que Parkin (une ubiquitine ligase) ou UCH-L1 (un enzyme désubiquitinant), sont associées à des formes familiales de maladie de Parkinson (Leroy et al., 1998; Corti et al., 2011; Dave et al., 2014). Enfin, l' α -synucléine elle-même peut inhiber le protéasome, soit sous forme monomérique (Snyder et al., 2003), soit sous forme fibrillaire, ou le séquestrer dans les dépôts protéiques (McNaught et al., 2001). Lors du vieillissement, tous ces systèmes, qui contrôlent la protéostase cellulaire, deviennent moins performants et moins capables de contrebalancer les stress aigus (Labbadia

et Morimoto, 2014). Ainsi, l'ensemble de ces défauts produise un environnement favorable pour que l' α -synucléine commence à s'agréger et conduise au développement d'une pathologie.

Troisièmement, les propriétés de l' α -synucléine pourraient favoriser l'apparition et le développement d'une synucléinopathie. En fonction de sa localisation cellulaire, l' α -synucléine pourrait avoir une probabilité d'agrégation plus ou moins grande. En effet, la fixation aux membranes augmenterait la probabilité d'assemblage en fibres. Ceci serait la conséquence d'une concentration locale plus forte à la surface de la membrane (Shrivastava et al., 2017). De plus, il a été proposé que l' α -synucléine serait en équilibre entre monomère et tétramère (Bartels et al., 2011; Wang et al., 2011; Dettmer et al., 2013), et que la forme tétramérique serait incapable de produire des assemblages fibrillaires. Ainsi, il est possible que les équilibres entre les formes monomériques et oligomériques, ainsi qu'entre les formes liées ou libres, influeraient sur la capacité de l' α -synucléine à former des fibres amyloïdes.

Quatrièmement, les modifications post-traductionnelles de l' α -synucléine pourraient conduire au développement d'une synucléinopathie. En effet, l' α -synucléine peut présenter des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations et des nitrations (Giasson et al., 2000; Oueslati et al., 2010; Barrett et Timothy Greenamyre, 2015). La plus connue de ces modifications post-traductionnelles est la phosphorylation sur la sérine 129. Celle-ci est décrite comme un facteur accélérant l'agrégation de l' α -synucléine (Samuel et al., 2016). Cette voie d'initiation est appuyée par le fait que 90 % de l' α -synucléine, dans les fibres, serait phosphorylée contre 4 % dans le cytoplasme (Fujiwara et al., 2002; Anderson et al.,

2006). Néanmoins, il n'est pas exclu non plus que cette modification post-traductionnelle intervienne alors que les agrégats sont déjà formés.

En conclusion, chacune de ces voies peut conduire à une dérégulation de la protéostase de l' α -synucléine. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de dire laquelle de ces hypothèses est la plus cruciale, mais plutôt que c'est l'ensemble de ces dysfonctionnements qui conduit au développement d'une synucléinopathie.

3. Les mutations de l' α -synucléine

Comme nous l'avons vu, des formes familiales de synucléinopathies sont liées à des duplications ou triplications du gène codant l' α -synucléine. De plus, des mutations ponctuelles dans la séquence de l' α -synucléine sont aussi impliquées dans des maladies parkinsoniennes (Fig. 8A). Ces mutations sont A30P (Krüger et al., 1998), E46K (Zarranz et al., 2004), H50Q (Appel-Cresswell et al., 2013; Proukakis et al., 2013), G51D (Kiely et al., 2013; Lesage et al., 2013), A53E (Pasanen et al., 2014; Martikainen et al., 2015) et A53T (Polymeropoulos et al., 1997). Les symptômes cliniques associés à ces mutations diffèrent : H50Q et A53T provoquent une maladie de Parkinson sévère avec des démences ; A30P conduit à une maladie de Parkinson plus proche de la forme sporadique ; E46K provoque des DLB ; G51D et A53E conduisent à une forme de synucléinopathie avec des caractéristiques de MSA (Goedert et al., 2017). Ces mutations confèrent à l' α -synucléine des propriétés d'agrégation spécifiques. Ainsi, E46K, H50Q et A53T s'agrègent plus rapidement (Serpell et al., 2000; Choi et al., 2004; Ghosh et al., 2013). A l'inverse, A30P, G51D et A53E s'agrègent moins rapidement et interagissent moins avec les phospholipides (Jensen et al., 1998; Narhi et al., 1999; Chandra et al., 2003; Fares et al., 2014; Ghosh et al., 2014; Rutherford et al., 2014).

4. La structure toxique des fibres d' α -synucléine

L'agrégation de l' α -synucléine forme un continuum d'assemblages allant du monomère à l'oligomère (espèce transitoire) qui, passé une certaine taille, donnera la fibre amyloïde. Des études ont cherché à identifier les formes toxiques pathogènes. Une première étude tendait à montrer que les oligomères sont plus toxiques que les fibres (Winner et al., 2011). Cependant, ce résultat est discutable. En effet, lors des tests, les concentrations en oligomères et fibres ont été ajustées en concentration de monomères. Alors qu'un oligomère contient jusqu'à une cinquantaine de monomères, une fibre est composée de plusieurs milliers de chaînes polypeptidiques. Ainsi, si la concentration monomérique est convertie en concentration de particules, il apparaît qu'il y a eu bien plus de particules d'oligomères que de particules de fibres dans ce test. Lorsque la toxicité spécifique est calculée par particule, en prenant des fibres fragmentées, il apparaît que ces dernières sont bien plus toxiques que les oligomères (Pieri et al., 2012, 2016). Pour cette raison il est suggéré que c'est sous forme de fibres amyloïdes que l' α -synucléine est la plus toxique (Melki, 2018a).

IV. Les synucléinopathies : des maladies prions ?

Un débat récurrent anime la communauté scientifique, dont l'objet est de déterminer si les synucléinopathies peuvent être définies comme des maladies à prion. Pour qu'une protéine puisse être définie comme un prion, celle-ci doit répondre à un certain nombre de critères (Soto, 2003; Lee et Yu, 2005; Cobb et Surewicz, 2009; Frost et Diamond, 2010; Moreno-Gonzalez et Soto, 2011; Soto et Satani, 2011; Münch et Bertolotti, 2012; Prusiner, 2013) :

- 1- La forme prion a une structure différente de la forme native ;
- 2- La pathologie nécessite l'expression de la protéine prion ;
- 3- La forme prion peut recruter la protéine endogène saine ;
- 4- La forme prion résiste à la protéolyse ;
- 5- La forme prion s'accumule dans les tissus ;
- 6- La forme prion induit la dégénérescence cellulaire ;
- 7- Existence d'une barrière d'espèces ;
- 8- La forme prion se propage de cellule à cellule ;
- 9- Il existe un phénomène de souches pouvant causer différentes pathologies.

1. La forme prion a une structure différente de la forme native

Oui : l' α -synucléine existe sous plusieurs conformations. La forme native est non-structurée ou composée d'hélices α au contact des membranes (Weinreb et al., 1996; Davidson et al., 1998; Eliezer et al., 2001). La forme pathogène a une structure de nature amyloïde, majoritairement composée de feuillets β (Fig. 9) (Serpell et al., 2000; Cremades et al., 2012; Bousset et al., 2013; Chen et al., 2015; Araki et al., 2015).

2. La pathologie nécessite l'expression de la protéine prion

Oui : des modèles de souris SNCA $-/-$ ne développent pas de maladie que ce soit dans un modèle de DLB, ou après injection de fibres ou d'homogénats de cerveaux

de patients synucléinopathiques (Lim et al., 2011; Luk et al., 2012a, 2012b; Recasens et al., 2014). De plus, des rats modèles, où l'expression de l' α -synucléine a été diminuée grâce à l'expression d'ARN interférant, comme des souris SNCA +/-, développeront moins de pathologie après injection de pesticides ou de fibres respectivement (Lim et al., 2011; Luk et al., 2012a, 2012b; Zharikov et al., 2015). Enfin, plus la protéine est exprimée, plus la pathologie survient précocement (la duplication ou la triplication du gène SNCA conduit à une maladie de Parkinson familiale (Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004; Ibáñez et al., 2004)). Toutes ces observations démontrent bien un lien entre l'expression de la protéine et le développement de la maladie.

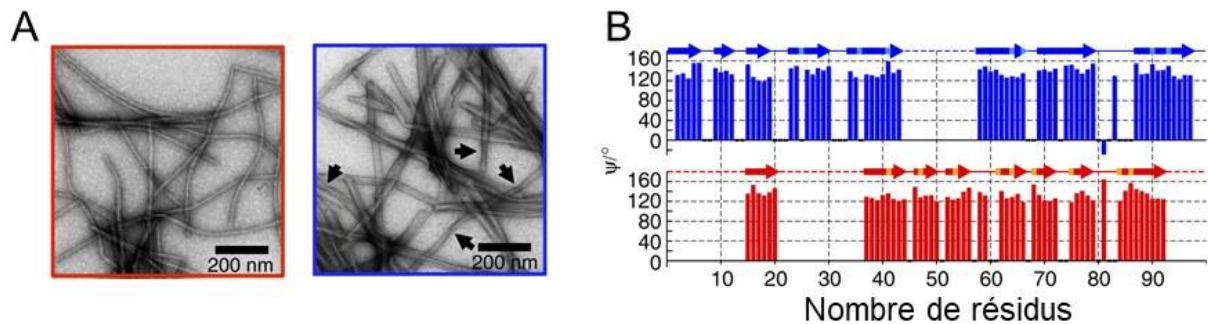


Figure 9 : Structures amyloïdes de deux souches d' α -synucléine. En rouge est représentée la souche " fibre " et en bleu est représentée la souche " rubans ". A : Image de microscopie électronique à transmission. Les " fibres " d' α -synucléine apparaissent fines et souples. Les " rubans " sont plus larges, et semblent cassant de par la présence de coude. Des torsades sont visibles pour les " rubans " (indiquées par les flèches). B : Prédiction de structure réalisée à partir d'un spectre de résonance magnétique nucléaire à l'état solide. Le résultat affiché a été produit par le logiciel de prédiction TALOS et indique les angles Ψ résidu par résidu. La présence et les localisations des feuillets β suggérés sont représentées par des flèches au-dessus du graphique. Cette prédiction permet de mettre en avant que, contrairement aux " fibres ", les " rubans " sont extrêmement ordonnés dans la partie N-terminale. Adaptée de (Bousset et al., 2013).

3. La forme prion peut recruter la protéine endogène saine

Oui : *in vitro*, la forme fibrillaire de l' α -synucléine peut s'allonger par incorporation d' α -synucléine monomérique (Dobson, 2003; Bousset et al., 2013; Kim et al., 2016). De plus, dans des cultures cellulaires exprimant de l' α -synucléine marquée avec une protéine fluorescente, l'exposition à des fibres provoque l'agrégation de l' α -synucléine endogène (Fig. 10) (Hansen et al., 2011; Bousset et al., 2013; Woerman et al., 2015; Ma et al., 2016; Pieri et al., 2016). Finalement, *in vivo*, chez la souris, des fibres injectées vont provoquer l'agrégation de l' α -synucléine endogène (Hansen et al., 2011; Luk et al., 2012a, 2012b; Osterberg et al., 2015; Peelaerts et al., 2015).

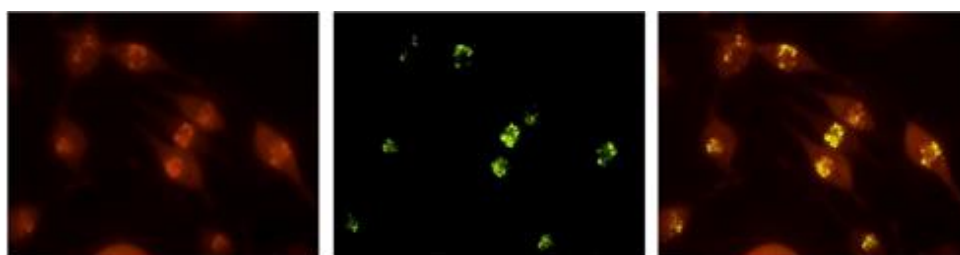


Figure 10 : Propagation de fibres amyloïdes d' α -synucléine en culture cellulaire. Dans une culture cellulaire exprimant de l' α -synucléine marquée par la mCherry-FP (à gauche), les assemblages d' α -synucléine, marqués avec l'Atto 488 (au centre), sont capables de pénétrer les cellules et d'incorporer l' α -synucléine endogène. En effet, une colocalisation des assemblages et de la protéine endogène est observée (à droite). Adaptée de (Bousset et al., 2013).

4. La forme prion résiste à la protéolyse

Oui : de nombreuses études montrent que les assemblages d' α -synucléine sont plus résistants, que la forme monomérique, tant à la protéolyse effectuée par des protéases (généralement la protéinase K (Fig. 11)), qu'à la dégradation effectuée par

des cellules neuronales ou gliales (Bousset et al., 2013; Chen et al., 2015; Kim et al., 2016; Ma et al., 2016; Pieri et al., 2016).

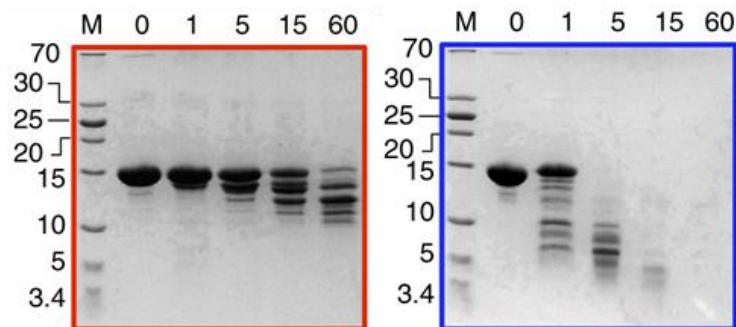


Figure 11 : Profils de protéolyses ménagées de deux souches d' α -synucléine. En rouge est représentée la souche " fibre " et en bleu est représentée la souche " rubans ". Les " fibres " sont plus résistantes à la protéolyse, car le produit initial reste présent jusqu'à 60 min, que les " rubans " où le produit initial n'est plus détecté après 5 min de protéolyse (échelle de temps annotée en haut des gels, de 0 à 60 en minutes). La protéolyse a été réalisée avec 3,8 μ g/mL de protéinase K. Adaptée de (Bousset et al., 2013).

5. La forme prion s'accumule dans les tissus

Oui : l' α -synucléine s'accumule dans les tissus sous forme d'inclusions caractéristiques des synucléinopathies (Goedert et Spillantini, 1998; Duyckaerts, 2000; Duyckaerts et al., 2015). Ces dépôts peuvent être induits soit par des LB extraits de cerveaux, soit par des fibres recombinantes (Luk et al., 2009). Enfin, les dépôts d' α -synucléine ont une durée de vie d'environ 16 mois, témoignant bien de la persistance de ceux-ci (Greffard et al., 2010).

6. La forme prion induit la dégénérescence cellulaire

Oui : l'injection d'homogénats de cerveaux de souris âgées modèles de la maladie de Parkinson, et contenant des dépôts d' α -synucléine, à des souris jeunes, induit le

développement de la maladie chez ces dernières, illustré par la formation de dépôts de type LB, ainsi qu'une baisse de l'espérance de vie (Luk et al., 2012b; Mougenot et al., 2012; Bétemps et al., 2014). De même, l'injection d'extraits d'homogénats de cerveaux de patients synucléinopathiques à des souris, ou des singes, provoque l'agrégation de l' α -synucléine endogène associée à de la mort cellulaire (Greffard et al., 2010; Masuda-Suzukake et al., 2013; Watts et al., 2013; Recasens et al., 2014). Dans le cas où les dépôts ont été immunodéplétés de l' α -synucléine au préalable, comme avec des homogénats de cerveaux de patients contrôles, les animaux ne développent pas de maladie (Recasens et al., 2014). Ceci permet de démontrer que l' α -synucléine contenue dans les dépôts peut transmettre la pathologie. De plus, l'injection de fibres recombinantes à des souris, ou l'exposition de culture cellulaires à des fibres, provoque une mort cellulaire (Desplats et al., 2009; Luk et al., 2012a, 2012b; Pieri et al., 2012; Bétemps et al., 2014; Pieri et al., 2016). Enfin, en présence d'anticorps ciblant l' α -synucléine agrégée (en culture cellulaire ou chez l'animal), un retard du développement de la maladie est observé, illustré par une baisse du nombre de dépôts, et de leurs diffusions (Tran et al., 2014).

Les mécanismes impliqués dans la toxicité des agrégats peuvent avoir plusieurs origines. Trois voies principales sont décrites (Fig. 12). Premièrement, les fibres pourraient affecter l'intégrité cellulaire des neurones. Par exemple, les fibres peuvent perméabiliser la membrane plasmique pouvant causer de la mort cellulaire (Volles et al., 2001; Caughey et Lansbury, 2003; Danzer et al., 2007; Pieri et al., 2012, 2016).

Deuxièmement, les assemblages pourraient affecter la fonction des neurones, soit par une perte de fonction de l' α -synucléine agrégée (qui ne remplirait plus sa

fonction au niveau des synapses), soit par un gain de fonction de la forme fibrillaire. En effet, les fibres peuvent interagir avec des partenaires tels que la sous-unité $\alpha 3$ de la pompe Na^+/K^+ neuronale (Shrivastava et al., 2015). Certaines de ces interactions seraient toxiques pour la cellule, par exemple dans le cadre d'un blocage d'une pompe, ou plus généralement en affectant les voies de signalisations de la cellule. De plus, les fibres amyloïdes d' α -synucléine sont décrites comme pouvant activer les cellules gliales. Cette activation provoque la mise en place de voies inflammatoires, pouvant induire un stress des neurones suivit d'une mort neuronale (Zhang et al., 2005; Luk et al., 2012b).

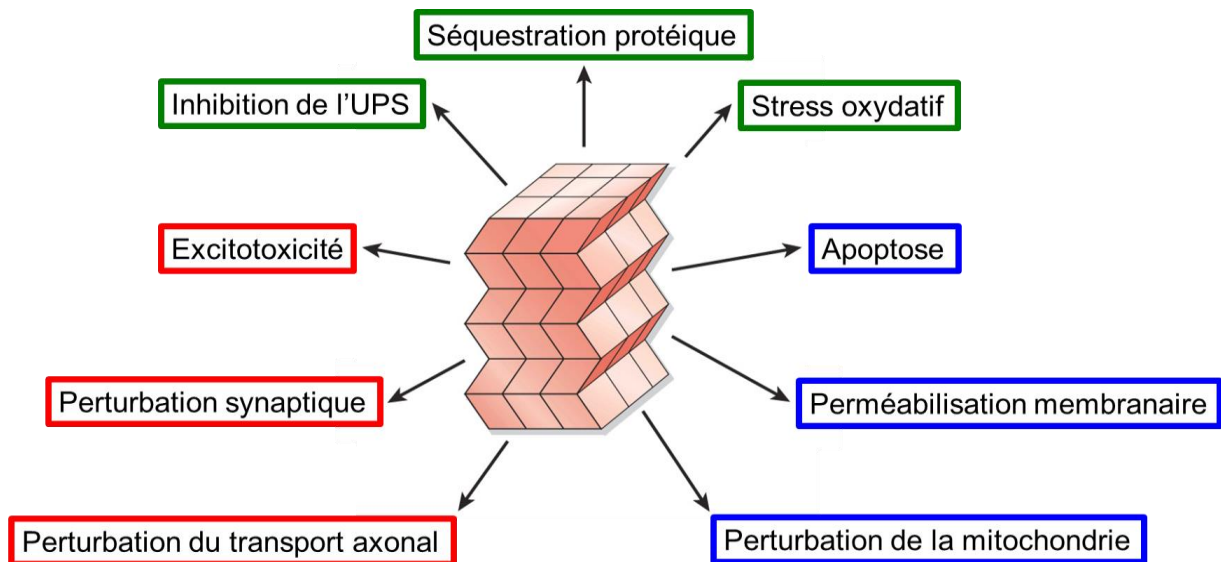


Figure 12 : Potentiels mécanismes de toxicité d'une fibre amyloïde. En bleu, rouge et vert sont différenciées les principales voies de toxicité affectant soit l'intégrité cellulaire, soit la fonction neuronale, soit la protéostase respectivement. Adaptée de (Forman et al., 2004).

Troisièmement, en dérégulant les systèmes de contrôle, les fibres peuvent affecter la protéostase des cellules. Les dépôts protéiques sont composés, en leur centre, d'un ensemble de protéines dont des chaperons moléculaires ainsi que des protéines de l'UPS (McNaught et al., 2001; Dobson, 2003; Wakabayashi et al.,

2013). Le pourtour de ces dépôts est principalement formé des fibres d' α -synucléine (Araki et al., 2015). Ainsi, la séquestration de ces protéines va perturber la protéostase des cellules, induisant ainsi des mécanismes de mort cellulaire (par exemple, par accumulation de protéines mal-repliées dues à la diminution de quantité de chaperons disponibles, par l'accumulation d'oxydation, etc.).

7. Existence d'une barrière d'espèces

Oui : *in vitro*, il a été démontré que des fibres d' α -synucléine humaines s'allongent plus rapidement en présence d' α -synucléine monomérique humaine, qu'en présence d' α -synucléine de souris et inversement (Fares et al., 2016; Luk et al., 2016). En culture cellulaire, ou *in vivo* chez la souris, les mêmes observations ont pu être faites concernant la pathogénicité des assemblages (Luk et al., 2016).

8. La forme prion se propage de cellule à cellule

Oui : les premières évidences, montrant que la pathologie peut se propager, remontent à 2008. Dans le cadre d'un traitement contre la maladie de Parkinson, des patients ont subi des greffes de neurones fœtaux afin d'essayer de compenser la perte de neurones dopaminergiques. De manière surprenante, le greffon présentait des dépôts proportionnellement à la durée post-greffe (2 à 5 % à dix ans et 11 à 12 % des neurones à vingt-quatre ans post-greffe). Or, des neurones de cet âge ne devraient pas présenter de dépôts protéiques (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008; Kordower et Brundin, 2009; Li et al., 2010; Kordower et Olanow, 2016; Li et al., 2016). Ce résultat fut reproduit chez l'animal confirmant la capacité de propagation *in vivo* de l' α -synucléine sous forme de fibres amyloïdes (Desplats et al., 2009; Hansen et al., 2011; Kordower et al., 2011; Angot et al., 2012). Par ailleurs, l'injection de

fibres amyloïdes recombinantes, ou de dépôts purifiés issus de patients atteints de la maladie de Parkinson, de DLB, ou de MSA provoque le développement de la maladie au site d'injection mais aussi dans les régions connectées (Bétemps et al., 2014; Recasens et al., 2014; Bernis et al., 2015; Prusiner et al., 2015). En effet, la propagation des agrégats vers le cerveau peut se faire que l'injection soit intracérébrale, dans le bulbe olfactif, intraveineuse, intramusculaire ou dans la paroi du tractus gastro-intestinal (Phillips et al., 2008; Lebouvier et al., 2009; Luk et al., 2012a, 2012b; Rey et al., 2013; Holmqvist et al., 2014; Sacino et al., 2014; Peelaerts et al., 2015; Rey et al., 2016).

Les mécanismes de propagation des agrégats se décomposent en trois étapes : l'entrée, le transport et le réexport. L'une des voies d'entrée la plus probable est l'endocytose des fibres par les cellules (Lee et al., 2008; Desplats et al., 2009; Hansen et al., 2011; Steiner et al., 2011; Holmes et al., 2013). Puis, les assemblages seraient transportés activement dans les axones des neurones, de manière antérograde ou rétrograde, jusqu'à leurs relargages (Braak et al., 2003a; Freundt et al., 2012; Brahic et al., 2016; Rey et al., 2016). Toutefois, il n'est pas clair si la propagation des dépôts nécessite ou non un contact synaptique (Hansen et al., 2011; Freundt et al., 2012; Shrivastava et al., 2017; Tyson et al., 2017).

9. Il existe un phénomène de souches pouvant causer différentes pathologies

Depuis la découverte que l' α -synucléine peut former des agrégats amyloïdes, de nombreuses structures fibrillaires ou oligomériques, ayant différentes propriétés, ont été caractérisées (Näsström, 2011; Cremades et al., 2012; Bousset et al., 2013; Guo et al., 2013; Gath et al., 2014; Chen et al., 2015; Kim et al., 2016; Ma et al., 2016;

Makky et al., 2016; Pieri et al., 2016). Par exemple, les assemblages amyloïdes d' α -synucléine appelés " fibres " ou " rubans " constituent deux souches distinctes montrant de nombreuses différences. Les " fibres " d' α -synucléine, par rapport aux " rubans ", s'agrègent plus vite, ont peu de feuillet β dans la partie N-terminale de la protéine, ont une résistance à la protéolyse plus importante et sont plus toxiques (Fig. 9 et 11) (Bousset et al., 2013; Gath et al., 2014).

Toutefois, différentes souches n'impliquent pas nécessairement différentes pathologies *in vivo*. Cependant, l'injection de " fibres " à des rats conduit à la formation de dépôts neuronaux de type LB, alors que l'injection de " rubans ", en plus de provoquer des dépôts neuronaux de type LB, conduit à la formation d'inclusions cytoplasmiques dans les oligodendrocytes (Peelaerts et al., 2015). Or, ces inclusions dans les cellules gliales sont la principale marque de la MSA (Fig.13).

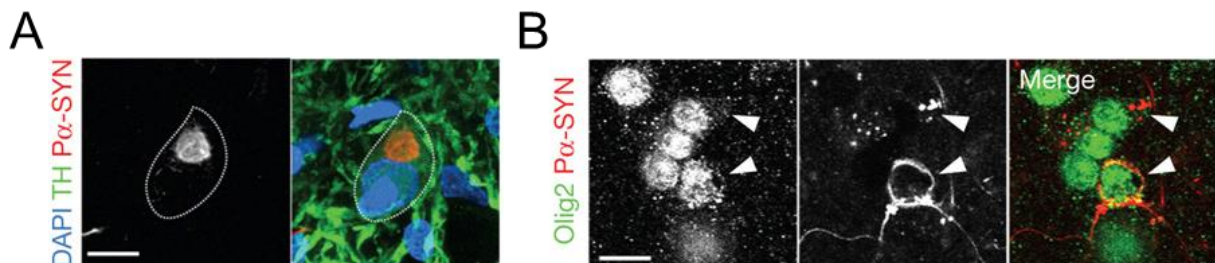


Figure 13 : Comparaison de la localisation des dépôts protéiques après injection de deux souches d' α -synucléine chez le rat. A : Après injection de " fibres " ou de " rubans ", des inclusions (marqueur P α -Syn) sont détectées dans les neurones dopaminergiques (marqueur tyrosine hydroxylase : TH). B : Seule l'injection de " rubans " a permis de détecter des inclusions (marqueur P α -Syn) dans des oligodendrocytes (marqueur Olig2). Adaptée de (Peelaerts et al., 2015).

Cette étude tend ainsi à suggérer que chaque synucléinopathie pourrait être causée par l'agrégation de l' α -synucléine en assemblages de structures distinctes. Cette hypothèse est aussi appuyée par l'observation que les fibres amyloïdes

présentes dans les LB sont légèrement plus fines que celles présentes dans les inclusions cytoplasmiques des MSA (5 à 10 nm contre 5 à 18 nm de diamètre respectivement) (Spillantini et al., 1998a, 1998b).

10. Conclusions

Les synucléinopathies ne sont pas définies comme étant des maladies prions pour deux raisons. Premièrement, contrairement au prion PrP où des cas iatrogènes ou alimentaires ont été décrits, il n'a pas été montré, à l'heure actuelle, de cas comme cela pour les synucléinopathies. Une explication pourrait provenir du nombre de cas. Effectivement, pour la CJD, le faible nombre de cas (en centaines) a permis de faire un lien entre source contaminante et nouveaux cas (par exemple, pour l'épidémie de la vache folle ou les hormones de croissances). Au contraire, pour les synucléinopathies, une augmentation d'une dizaine de milliers de patients, à cause d'une contamination iatrogène ou alimentaire, ne serait pas détectée vu le nombre de cas recensés (en millions) (Peelaerts et al., 2018). Deuxièmement, comme nous l'avons vu, l' α -synucléine est capable de former différentes souches pouvant avoir des caractéristiques de différentes maladies. Cependant, jusqu'à présent, il n'a jamais été démontré que, pour chaque synucléinopathie il existe une souche spécifique.

Pour ces raisons, il est plus raisonnable de dire que les synucléinopathies ont un fonctionnement similaire à celui du prion PrP. Ainsi, le terme " prion-like " est préféré (Olanow et Prusiner, 2009; Brundin et al., 2010; Cushman et al., 2010; Steiner et al., 2011; Melki, 2018b).

Travaux de thèse

I. Mise en place d'une méthode fiable d'amplification des assemblages amyloïdes d' α -synucléine présents dans des tissus de patients atteints de synucléinopathies

Les dépôts d' α -synucléine présents dans le cerveau sont un assemblage complexe de nombreuses protéines (α -synucléine, chaperon moléculaire, protéasome, etc ...). L'étude biochimique et biophysique des assemblages d' α -synucléine nécessite d'avoir accès à des protéines purifiées. Le but de ma thèse a donc été de mettre en place une méthode permettant d'obtenir des assemblages d' α -synucléine identiques à ceux retrouvés chez les patients atteints de synucléinopathies. Les assemblages ainsi obtenus permettront leurs études par des approches biochimiques, biophysiques, de biologie cellulaire ou encore *in vivo* par réinjection à des animaux. Il sera alors possible de tester l'hypothèse où chaque synucléinopathie est caractérisée par la présence d'une structure / souche particulière d' α -synucléine.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la technique de PMCA (" **P**rotein **M**isfolding **C**yclic **A**mplification " : amplification cyclique de protéines mal-repliées). A l'origine, cette technique a été mise en place pour l'amplification des formes pathogènes du prion PrP (Saborio et al., 2001; Soto et al., 2002). En effet, Saborio *et al.* ont montré que, lorsqu'un homogénat de cerveau malade est mis en présence d'un large excès de protéine PrP saine, issus d'homogénats de cerveaux sains, la forme saine est convertie en forme pathogène. La conformation de la forme pathologique étant transmise à la forme saine, cette technique permet l'amplification de la forme pathologique *in vitro*. Jusqu'à présent, pour amplifier les dépôts amyloïdes, il était nécessaire de réinjecter les homogénats de cerveaux malades à des animaux sains. Cependant, les temps d'incubation chez l'animal sont très longs, entre 60 jours et 40 ans de la souris à l'Homme respectivement (Fig. 14). A l'inverse, la PMCA permet d'amplifier des fibres en seulement quelques dizaines d'heures.

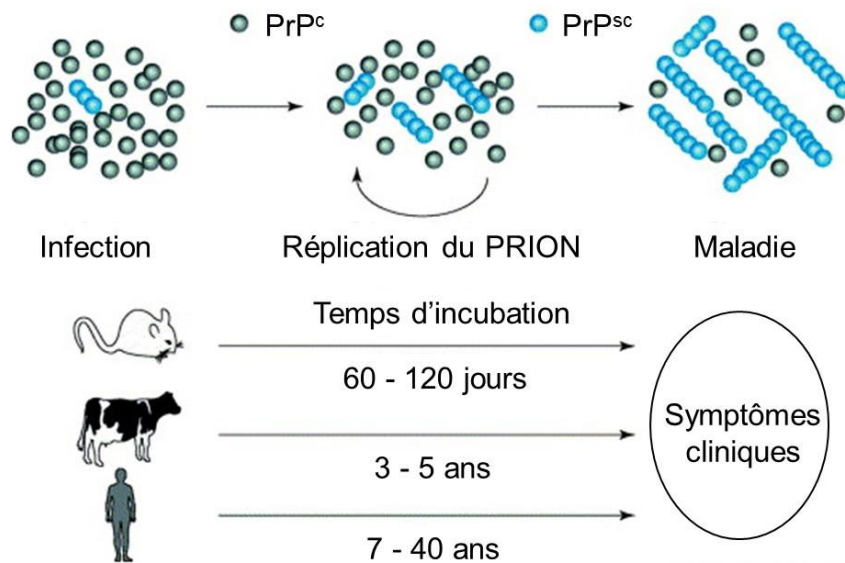


Figure 14 : Réplication du prion PrP durant le développement d'une des encéphalopathies spongiformes transmissibles. Cette illustration met en avant les temps d'incubation pour développer les symptômes cliniques après infection. Ainsi, le temps d'incubation correspond à la durée pré-symptomatique des pathologies, bien que l'agent soit présent chez les individus. Adaptée de (Soto et al., 2002)

La technique de l'amplification par PMCA repose sur un fonctionnement proche de la PCR (" **P**olymerase **C**hain **R**eaction " : réaction en chaîne de la polymérase). Les fibres servent de matrice à la manière de l'ADN lors de la PCR, la protéine sous forme monomérique a le rôle des nucléotides et les ultrasons remplacent les cycles de température, en cassant les fibres allongées pour générer de nouvelles amorces.

Effectivement, la PMCA est divisée en deux grandes phases. La première est appelée " élongation ", où les fibres s'allongent par incorporation de monomères. Cette étape sera plus ou moins longue selon la protéine étudiée et son pouvoir agrégant. La seconde phase est appelée " fragmentation ", où les fibres sont cassées en de plus petites structures augmentant le nombre d'extrémités disponibles. Or, comme nous avons pu le voir, les fibres amyloïdes s'allongent spontanément par

incorporation de protéines monomériques, ayant une conformation compatible, à leurs extrémités. Ainsi, le processus de fragmentation des fibres augmente le nombre d'extrémités disponibles, et donc permet une incorporation de plus en plus rapide de la protéine substrat monomérique. En répétant ces deux étapes de nombreuses fois, les formes monomériques seront totalement converties sous la forme pathologique, identique à celle présente dans les cerveaux malades (Fig. 15).

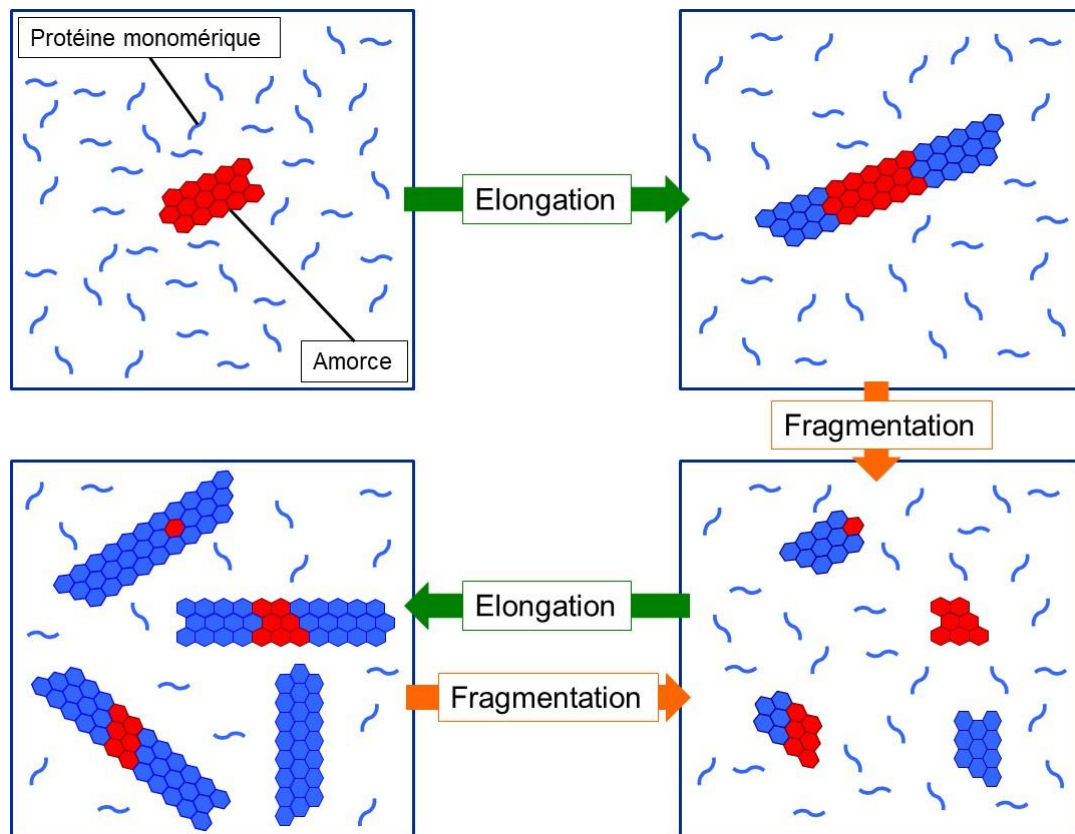


Figure 15 : Schéma du fonctionnement de la PMCA. En bleu est représenté la protéine recombinante soit sous forme saine (filament) soit sous forme agrégée (hexagone). En rouge est représentée la protéine pathologique agrégée, présente dans le cerveau des patients, qui sert d'amorce. Les flèches vertes correspondent à l'étape d'élongation, où les fibres peuvent s'allonger en incorporant des monomères. Les flèches orange correspondent à l'étape de fragmentation, où les fibres sont cassées pour générer de plus en plus d'amorces. L'étape de fragmentation se fait généralement par sonication. Comme le montre les deux cases du bas, la PMCA se fait par une répétition cyclique des étapes d'élongation et de fragmentation.

L'adaptation de la PMCA pour l'amplification de fibres recombinantes d' α -synucléine nous a révélé des différences importantes entre le prion PrP et l' α -synucléine. Contrairement à la PrP, l'amplification d' α -synucléine agrégée peut se faire dans un contexte purement artificiel, avec des fibres et de la protéine recombinantes, sans ajout de cofacteurs, et conduisant quand même à des formes infectieuses. J'ai déterminé les conditions expérimentales de la PMCA, pour amplifier spécifiquement les dépôts provenant de patients atteints de chacune des synucléinopathies, sans qu'aucune agrégation *de novo* ne soit détectable en présence d'homogénats de cerveaux contrôles. Pour cela, j'ai fait varier les paramètres de sonication (méthode et durée des cycles) et de milieux (tampon, concentration d'amorces et de substrats), en utilisant des prélèvements de différentes régions du cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson, de DLB ou de MSA, fournis par la banque de cerveaux française NeuroCEB. Par la suite, j'ai pu confirmer la spécificité de la technique sur des cerveaux de patients atteints de synucléinopathies provenant d'autres banques : la Parkinson's United Kingdom Brain Bank et l'Oxford Brain Bank. J'ai aussi pu tester la technique sur des tissus fixés de patients atteints de la maladie de Parkinson ou de MSA fournis par Kelly Del Tredici-Braak. De plus, j'ai testé la méthode avec des neurones du système nerveux périphérique (ganglions stellaires) de patients atteints de la maladie de Parkinson, fournis par Miquel Vila.

Dans ce manuscrit, je vais présenter les résultats qui ont été obtenus dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Pascal Derkinderen. Ce projet a eu pour but d'amplifier les assemblages présents dans les dépôts issus de biopsies du système digestif de patients atteints de la maladie de Parkinson. Les biopsies gastriques sont aisément accessibles du vivant d'un patient, et pourraient être une source pour un

diagnostic prédictif des synucléinopathies. Ces résultats, couplés aux analyses histologiques des biopsies, ont permis de valider la méthode et de préciser le choix dans la région du tractus digestif où effectuer les biopsies. Nous avons démontré, par analyse histologique et amplification par PMCA, que les régions du côlon sigmoïde et de l'antrum présentent des dépôts caractéristiques de la maladie de Parkinson. Aucun dépôt spécifique n'a pu être détecté dans les biopsies issues du rectum. Ces résultats rejoignent d'autres études qui rapportent que, dans la maladie de Parkinson, la présence de dépôts dans le système nerveux entérique n'est pas très abondante ou systématique, et forme un gradient rostro-caudal le long du tractus digestif (Beach et al., 2010; Annerino et al., 2012; Pouclet et al., 2012).

Detection of alpha-synuclein aggregates in gastrointestinal biopsies by Protein Misfolding Cyclic Amplification

Alexis Fenyi¹, Laurène Leclair-Visonneau^{2,3}, Thomas Clairembault², Emmanuel Coron^{2,3}, Michel Neunlist^{2,3}, Ronald Melki¹, Pascal Derkinderen^{2,3,4} and Luc Bousset¹

¹Institut François Jacob (MIRCen), CEA and Laboratory of Neurodegenerative Diseases, CNRS, 18 Route du Panorama, 92265 Fontenay-Aux-Roses cedex, France.

²Inserm, U1235, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes, France

³University Nantes, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes, France

⁴CHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, Bd Jacques Monod, F-44093 Nantes, France

Author Email Addresses:

Alexis Fenyi (alexis.fenyi@cns.fr)

Ronald Melki (ronald.melki@cns.fr)

Laurène Leclair-Visonneau (laurene.leclair@chu-nantes.fr)

Thomas Clairembault (clairembault.thomas@gmail.com)

Emmanuel Coron (emmanuel.coron@chu-nantes.fr)

Michel Neunlist (michel.neunlist@univ-nantes.fr)

Pascal Derkinderen (derkinderenp@yahoo.fr)

Luc Bousset (luc.bousset@cns.fr)

Corresponding authors:

Dr Luc Bousset: Institut Francois Jacob (MIRCent), CEA and Laboratory of Neurodegenerative Diseases, CNRS, 18 Route du Panorama, 92265 Fontenay-Aux-Roses cedex, France. luc.bousset@cnrs.fr;

Dr Pascal Derkinderen: Inserm, U1235, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes, France ; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr, derkinderenp@yahoo.fr

Abstract

Lewy bodies and neurites, the pathological signatures found in the central nervous system of Parkinson's disease (PD) patients, are primarily composed of aggregated alpha-synuclein (aSyn). The observation that aSyn aggregates are also found in the enteric nervous system has prompted several studies aimed at developing a diagnostic procedure based on the detection of pathological aSyn in gastrointestinal (GI) biopsies. The existing studies, which have all used immunohistochemistry for the detection of pathological aSyn, have had conflicting results. In the current survey, we analyzed the seeding propensity of aSyn aggregates from GI biopsies.

A total of 29 subjects participated to this study, 18 PD patients and 11 controls. For each patient, 2 to 4 GI biopsies were taken from the same site (antrum, sigmoid colon or rectum) and used to seed the aggregation of recombinant aSyn in an assay inspired from the Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) method. In a subset of patients and controls (14 and 3, respectively), one or two additional biopsies were analyzed by immunohistochemistry for the presence of phosphorylated aSyn histopathology (PASH) using antibodies against phosphorylated aSyn and PGP 9.5.

Except for one subject, none of the control samples seeded aSyn aggregation in PMCA reaction. GI biopsies from patients with PD seeded aSyn aggregation in 10

out of 18 cases (7 from the sigmoid colon, 2 from the antrum and one from the rectum). There was good agreement between PMCA and immunohistochemistry results as, except for two cases, all PMCA-positive PD patients were also PASH-positive.

Our findings show that the PMCA method we implemented is capable of detecting aSyn aggregates in routine GI biopsies. They also suggest that rectum biopsies do not contain sufficient amounts of aggregated aSyn to detect seeded assembly by PMCA. While encouraging, our findings indicate that further studies are needed to establish the diagnostic potential of the PMCA method we implemented to detect aSyn aggregates in upper GI biopsies.

Keywords

Alpha-synuclein; Parkinson's disease; Protein Misfolding Cyclic Amplification; gut; enteric nervous system; biopsy

List of abbreviations

aSyn – alpha-synuclein

CNS – central nervous system

CSF – cerebrospinal fluid

ENS – enteric nervous system

FFPE – Formalin-fixed, paraffin-embedded

GI – gastrointestinal

PASH – phosphorylated aSyn histopathology

PD -Parkinson's disease

PGP9.5 -Protein Gene Product 9.5

PMCA – Protein Misfolding Cyclic Amplification

ThT - Thioflavine T

Introduction

The *postmortem* detection by immunohistochemistry of aggregated alpha-synuclein (aSyn) in the brain along with neuronal loss in the *substantia nigra* remain the gold standard for the definite diagnosis of Parkinson's disease (PD). Over the last 12 years, several studies have shown that aSyn aggregates can also be detected outside the central nervous system, particularly in the enteric nervous system (ENS) [1–4]. The ENS is a neuronal network embedded in the lining of the gastrointestinal tract (GI) from the lower third of the esophagus to the rectum, whose distinguishing feature is its accessibility and suitability for routine GI biopsies [5]. These findings logically prompted a substantial amount of research to determine if the immunohistochemical detection of pathological aSyn in routine GI biopsies could be used for pathological diagnosis of PD within patients lifespan (reviewed in [6,7]).

In our seminal study, using microdissection and whole-mount preparation of colonic biopsies, we detected aSyn pathology in 21 out of 29 PD patients and in none of the controls [8]. Although the microdissection technique we have developed provides outstanding information on the morphology of enteric neurons, it nonetheless has several limitations as it needs to be performed immediately after the endoscopic procedure and requires technical expertise and training [5]. Most subsequent studies on GI biopsies in PD have therefore been performed on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue, which has the main advantages of being readily accessible to most hospital-based laboratories and to allow retrospective analyses. Nevertheless, the diagnostic utility of FFPE GI biopsies in PD remains

unclear, as these studies yielded conflicting results regarding the sensitivity and specificity of GI biopsies in detecting pathological aSyn [9–17].

One possible explanation for the observed discrepancies between existing studies on immunohistochemical detection of aSyn pathology in the ENS is the very low amount of aSyn aggregates usually found in GI samples. Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) enables ultrasensitive detection of the pathogenic prion protein PrP in Creutzfeldt-Jakob disease through amplification of its misfolding and aggregation *in vitro* under different experimental conditions [18]. This technique has been recently used to detect aggregated aSyn in the CSF of PD patients [19] and in formaldehyde-fixed samples from multiple system atrophy patients [20]. We implemented this method to assess the presence of pathogenic aSyn in GI biopsies.

Methods

Subjects, GI biopsies and study design

A total of 29 subjects participated to this study, 18 patients with PD and 11 controls. PD patients who were diagnosed according to the United Kingdom PD Society Brain Bank criteria were recruited from the movement disorder clinic at Nantes University Hospital, France. 16 out of 18 PD patients had a rectosigmoidoscopy or a colonoscopy, while the remaining 2 had upper GI endoscopy for placement of an administration tube for continuous levodopa enteral infusion. As controls, we used GI biopsies from 2 groups : (1) 7 subjects who had colonoscopy for colorectal cancer screening, (2) 4 subjects with Crohn's disease who underwent either rectosigmoidoscopy or colonoscopy for disease management and surveillance (Table 1). All control subjects had a detailed neurological examination to rule out PD symptoms and cognitive deficiency. Two to 4 biopsies per subject were snap frozen

in liquid nitrogen at the time of collection and stored at -80°C . 16 PD patients and 3 controls had additional biopsies (taken from the same site than the frozen biopsies, either in the sigmoid colon [2 biopsies] or in the rectum [1 biopsy]) that were analyzed by immunohistochemistry (see below). The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (*Comité de Protection des Personnes Ouest IV and VI*), conformed to the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and was registered on ClinicalTrials.gov (identifier NCT01353183 and NCT01748409). Written informed consent was obtained from each patient and from each control.

Reagents and chemicals

Unless otherwise stated all reagents were purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France)

Microdissection and immunohistochemistry

Microdissection was performed as previously described in one biopsy (when taken in the rectum) or two biopsies (when taken in the sigmoid colon) [6]. Each whole-mount preparation of submucosa obtained from a single biopsy was permeabilized for 3 hours in phosphate buffered saline (PBS)/ NaN_3 containing 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) horse serum and then incubated with antibodies against phosphorylated aSyn (1:5,000, WAKO, Osaka, Japan) and PGP9.5 (1:10,000; Ultraclone Limited, UK). A patient was noted as positive (phosphorylated aSyn histopathology, PASH+) when at least one structure immunoreactive for both phosphorylated aSyn and PGP9.5 was observed.

Biopsies treatment for amplification

2 to 4 Biopsies were weighted in a Safelock 2mL Biopur tube (Eppendorf, Montesson, France). The biopsies were resuspended 5% (weight: volume) in buffer (150mM KCl, 50mM Tris-HCl pH7.5) and disrupted by sonication using a Branson SFX 150 Cell Disruptor sonicator equipped with a 3.17mm microtip probe (Emerson, Bron, France). Sonication was applied for 10 seconds at 70% of the maximum amplitude. The resulting homogenate was aliquoted and flash frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C.

PMCA assay

Biopsies homogenates were diluted in 150mM KCl, 50mM Tris-HCl pH7.5 to a final proportion of 2% (weight: volume). Monomeric aSyn concentration was adjusted to 100µM in a total volume of 300µL. The volume was split in 2 tubes PCR strips (BIOplastics, Landgraaf, The Netherlands) tubes (150µl in each). PMCA amplification was performed using the Q700 generator and a 431MPX horn (both from Qsonica, Fisher scientific, Illkirch, France). The power of the horn was set to 30% of the maximum amplitude. The sonication protocol consisted of 15sec of sonication and 315sec of rest at 31°C. Every hour, 5µL from each tube were collected and diluted into 300µL Thioflavine T (ThT, 10µM). The amplification was monitored by measuring ThT fluorescence increase using a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent, les Ulis, France) with fixed excitation and emission wavelength at 440 and 480nm, respectively. The sensitivity of the method was assessed using recombinant preformed fibrils. The detection threshold was determined to be in the range of 10 pM of aggregated aSyn (Figure 1). PMCA efficacy was derived from the lag phase length and was considered high when the lag phase was shorter than 300 minutes and was

considered medium to low when it lied within the time frame 300 to 425 minutes.

Results

A total of 29 subjects participated to this study, 18 PD patients (12 males, mean age \pm standard deviation: 63.7 ± 7.7 years) and 11 controls (7 males, 52.4 ± 15.3 years). Age and sex did not differ significantly between patients and controls (Table 1).

GI biopsies (2 pooled biopsies from 6 PD, 3 pooled biopsies from 3 PD and 3 controls, 4 pooled biopsies from 9 PD and 8 controls (Table 1)) were blindly analyzed by means of PMCA (Figure 2). Except for subject #1, none of the GI biopsies homogenates from the control group, regardless of the biopsy site (sigmoid colon or rectum), seeded the aggregation of monomeric aSyn. Subject #28 was initially enrolled in 2008 as a control and as such had no signs or symptoms suggestive of PD. She underwent upper GI endoscopy for the investigation of anemia and 4 antrum biopsies were taken and stored as part of our research protocol. Because of the positive PMCA result, we decided to clinically reevaluate this patient 10 years after GI biopsies collection. Neurological examination showed that she had developed in the meantime typical signs and symptoms of PD, including right bradykinesia and mild bilateral rest tremor.

GI biopsies homogenates from patients with PD seeded monomeric aSyn aggregation in 10 out of 18 cases (table 1). Among these PMCA+ biopsies, 2 sets of biopsies were taken from the antrum, 7 sets of biopsies were taken in the sigmoid colon while the remaining one was from the rectum. Of note rectal biopsies from 3 out of 4 PD patients yielded negative results with PMCA. Identical results were observed for the rectal biopsies from control patients (Table 1).

The amount of seeds in PMCA+ samples were estimated by comparing Figure 1 and 2. Samples where PMCA efficiency was considered high contained over 1nM equivalent of pure recombinant aggregated pathogenic aSyn.

In 14 patients with PD and 3 controls, one or two additional biopsies were immunohistochemically assessed for the presence of PASH (Figure 3). All 3 controls as well as the 4 PD patients who had rectal biopsies were PASH- (Table 1). When sigmoid biopsies were analyzed, 5 out of 10 PD patients were PASH+ and among these 5 cases, 4 were also PMCA+ (table 1).

Discussion

Here, we have used GI biopsies from PD patients to show that aSyn aggregates from peripheral autonomic nervous system could be amplified through PMCA. Only one control biopsy induced aSyn aggregation suggesting that the seeding method we implemented has a high specificity. Regarding PD, 2/2 upper GI biopsies, 7/12 sigmoid biopsies and only 1/4 rectal biopsies were PMCA+. Although our sample size is too small to draw firm conclusions, our findings are in line with previous reports that showed a rostro-caudal distribution of aSyn pathology in the gut, with the lower esophagus and stomach having the highest frequency of PASH, followed by small bowel regions, colon and rectum [2,21,22]. They also suggest that rectal biopsies are not suited for PMCA-based PD diagnosis. There was significant agreement between PMCA and immunohistochemistry as 4 out of 5 PASH+ PD patients were also PMCA+. Samples from the remaining PMCA+ patients were either not assessed by immunohistochemistry (4 cases) or were PMCA+ but PASH- (2 cases). All PMCA+ and PASH+ samples originated from the sigmoid colon (4 cases). Limited agreement between PMCA and immunohistochemistry was observed for

rectal as none was PASH+ while 1 out of 4 was PMCA+. The same figure was observed for control samples. Altogether, our results suggest that rectal biopsies are not suited for PMCA-based PD diagnosis.

An interesting observation is the positive detection of aSyn aggregates in GI samples initially collected as controls from one subject who subsequently developed clinical symptoms of PD (subject #28). In a recent report that used aSyn PMCA in CSF, Shahnawaz *et al.* identified two subjects originally enrolled as controls who were subsequently diagnosed as having PD 1 and 4 years after sample collection [19]. These findings suggest that PMCA might be used as a preclinical or premotor diagnostic method for PD.

In conclusion, our preliminary study supports the idea that PMCA could be used to detect aSyn aggregates in GI biopsies from PD patients. Further studies are needed to establish the diagnostic potential of PMCA to detect aSyn aggregates in GI biopsies especially in the upper GI tract.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Regarding sigmoid biopsies sampling, the study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (*Comité de Protection des Personnes Ouest IV and VI*) and was registered on ClinicalTrials.gov (identifier NCT01353183 and NCT01748409). Written informed consent was obtained from each patient and from each control.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

None

Funding

This work was supported by a grant from Institut de France to PD. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 116060 (IMPRiND). This work is supported by the Swiss State Secretariat for Education, Research and Innovation (SERI) under contract number 17.00038. The opinions expressed and arguments employed herein do not necessarily reflect the official views of these funding bodies. We thank IMAGIF facility for access to Electron Microscopes. LB and RM were supported by Equipe FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) 2016 (DEQ2016033489) and the Fondation Simone et Cino Del Duca of the Institut de France.

Author Contributions

AF, RM, TC, PD and LB performed the experiments and analyzed the data. LLV and MN managed the biobanking and dissected the colonic samples. EC performed the endoscopy. AF, RM, PD and LB designed the research and wrote the manuscript.

References

1. Braak H, de Vos RAI, 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;396:67–72.
2. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White lii CL, et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*. 2010;119:689–702.
3. Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M. Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006;32:284–95.
4. Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, et al. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord*. 2014;29:1010–8.
5. Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, et al. Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil*. 2010;22:e11-14.
6. Corbillé A-G, Clairembault T, Coron E, Leclair-Visonneau L, Preterre C, Neunlist M, et al. What a gastrointestinal biopsy can tell us about Parkinson's disease? *Neurogastroenterol Motil*. 2016;28:966–74.
7. Schneider SA, Boettner M, Alexoudi A, Zorenkov D, Deuschl G, Wedel T. Can we use peripheral tissue biopsies to diagnose Parkinson's disease? A review of the literature. *Eur J Neurol*. 2016;23:247–61.
8. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen J-M, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS ONE*. 2010;5:e12728.
9. Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, et al. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012;27:709–15.
10. Chung SJ, Kim J, Lee HJ, Ryu H-S, Kim K, Lee JH, et al. Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: Limited role as a biomarker. *Mov Disord*. 2016;31:241–9.
11. Stokholm MG, Iranzo A, Østergaard K, Serradell M, Otto M, Svendsen KB, et al. Assessment of neuroinflammation in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a case-control study. *Lancet Neurol*. 2017;16:789–96.
12. Antunes L, Frasquilho S, Ostaszewski M, Weber J, Longhino L, Antony P, et al. Similar α -Synuclein staining in the colon mucosa in patients with Parkinson's disease and controls. *Mov Disord*. 2016;31:1567–70.

13. Barrenschee M, Zorenkov D, Böttner M, Lange C, Cossais F, Scharf AB, et al. Distinct pattern of enteric phospho-alpha-synuclein aggregates and gene expression profiles in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5:1.
14. Visanji NP, Marras C, Kern DS, Al Dakheel A, Gao A, Liu LWC, et al. Colonic mucosal a-synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease. *Neurology.* 2015;84:609–16.
15. Hilton D, Stephens M, Kirk L, Edwards P, Potter R, Zajicek J, et al. Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2014;127:235–41.
16. Sánchez-Ferro Á, Rábano A, Catalán MJ, Rodríguez-Valcárcel FC, Fernández Díez S, Herreros-Rodríguez J, et al. In vivo gastric detection of α -synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015;30:517–24.
17. Corbillé A-G, Letournel 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.
18. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature.* 2001;411:810–3.
19. Shahnawaz M, Tokuda T, Waragai M, Mendez N, Ishii R, Trenkwalder C, et al. Development of a Biochemical Diagnosis of Parkinson Disease by Detection of α -Synuclein Misfolded Aggregates in Cerebrospinal Fluid. *JAMA Neurol.* 2017;74:163–72.
20. Becker K, Wang X, Vander Stel K, Chu Y, Kordower J, Ma J. Detecting Alpha Synuclein Seeding Activity in Formaldehyde-Fixed MSA Patient Tissue by PMCA. *Mol Neurobiol.* 2018;55:8728–37.
21. Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, des Varannes SB, Rouaud T, Roy M, et al. A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2012;45:305–9.
22. Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol.* 1988;76:217–21.

Legends to Figures

Figure 1: PMCA of preformed recombinant aSyn fibrils. Increasing concentration of recombinant seeds were added in the reaction to assess the sensitivity of the PMCA method we implemented. The concentrations of recombinant fibrils are expressed as initial monomeric concentration. The curves represent the average of 4 replicates +/- SD.

Figure 2: PMCA assay in controls and PD. PMCA was performed using gastrointestinal biopsies homogenates from controls (A) or PD patients (B). aSyn seeded assembly reactions obtained in the presence of homogenates from sigmoid biopsies are coloured in blue (controls) and orange (PD patients). Those obtained in the presence of rectum colon biopsies homogenates are coloured in purple (controls) and red (PD patients). Those obtained in the presence of antrum biopsies homogenates are coloured in brown (PD patients). PMCA efficacy was considered high when the assembly kinetics lied within the grey surface area (lag phase shorter than 300 min). PMCA efficacy was considered medium or low when the assembly kinetics lied within the hatched grey surface area (lag phase comprised between 300 and 425 min). The curves represent an average of 2 replicates, +/- SD.

Figure 3. Phosphorylated alpha-synuclein histopathology (PASH) in the submucosa of PD patients. Sigmoid biopsies of two different PD patients were microdissected and analyzed by immunohistochemistry. The representative photomicrographs show multiple PASH (white arrows) in whole-mount of submucosa immunoreactive for PGP9.5 (green) that were also positive for phosphorylated alpha-synuclein (red). Scale bar: 25 μ m.

	Age, sex	Diagnosis	Biopsy			PMCA	
			Site	Number	PASH		
1	68/M	Control	Rectum	4	(0/1)	+	
2	58/F			4	(0/1)	-	
3	58/F			4	NA	-	
4	43/M			4	NA	-	
5	33/M ^{CD}		Sigmoid	3	NA	-	
6	30/M ^{CD}			3	NA	-	
7	51/M ^{CD}			3	NA	-	
8	37/F ^{CD}			4	NA	-	
9	74/F			4	NA	-	
10	53/M			4	(0/2)	-	
11	72/M			4	NA	-	
12	67/M	Parkinson's disease	Rectum	4	(0/1)	-	
13	66/M			4	(0/1)	-	
14	55/M			4	(0/1)	-	
15	68/F			4	(0/1)	+	
16	70/M		Sigmoid	4	(1/2)	++	
17	70/M			4	(0/2)	-	
18	55/M			4	NA	+	
19	47/F			3	NA	+	
20	53/M			2	(0/2)	-	
21	67/M			3	(0/2)	-	
22	58/M			3	(2/2)	++	
23	69/M			2	(2/2)	-	
24	72/F			2	(0/2)	-	
25	59/M			2	(0/2)	+	
26	58/F			2	(2/2)	+	
27	70/M			2	(2/2)	++	
28	72/F			Antrum	4	NA	++
29	70/F				4	NA	++

Table 1 : Histology and amplification summary.

Age and sex: age of patients at the time of the biopsies and gender; diagnosis: differentiates controls from parkinsonian patients, CD is for Crohn's disease; biopsy: site of the biopsy (site), number of biopsies used in the PMCA assay (number), result of the histological analysis (PASH; NA = not assessed; (X/Y) = number of positive biopsy[ies]); PMCA : amplification efficacy ranked, ++ : high amplification (lag phase was shorter than 300 minutes), + : low amplification (lag phase within a timeframe of 300 to 420 minutes), - : no amplification detected.

Figure 1

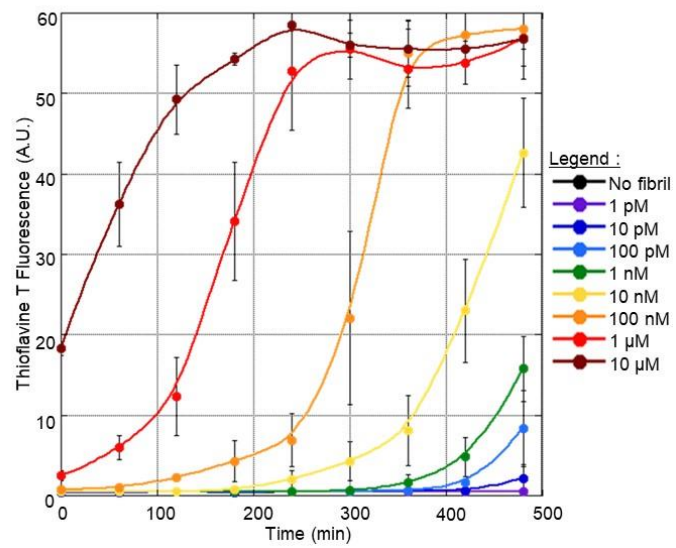


Figure 2

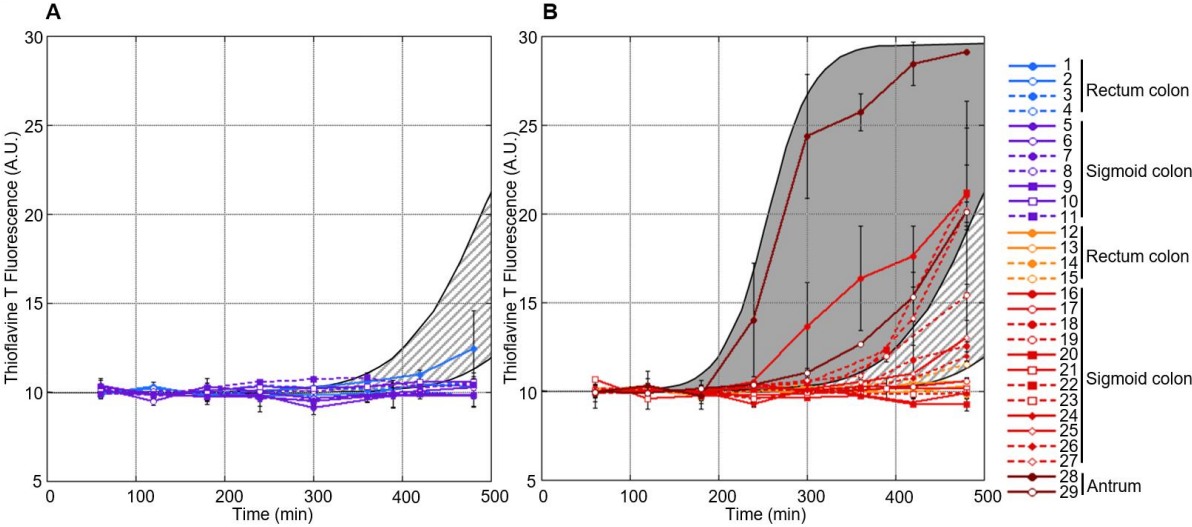
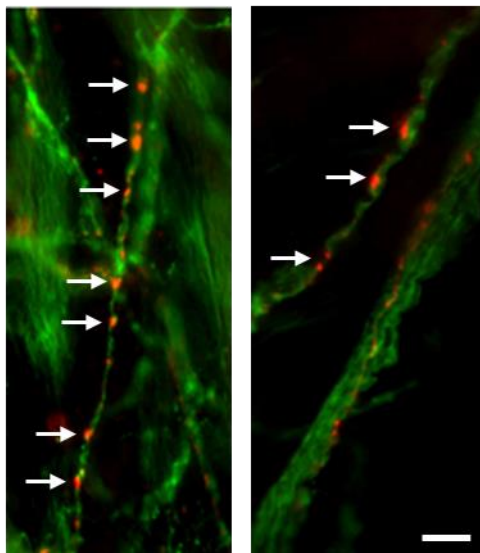


Figure 3



II. Mise en évidence d'agents permettant la décontamination de matériels de laboratoire souillés par diverses protéines en fibres amyloïdes

L' α -synucléine est suspectée d'agir comme un prion. Sous forme agrégée, elle pourrait conduire au développement d'une maladie si une personne est exposée par voie alimentaire, par inhalation via des aérosols, ou accidentellement en cas d'une coupure avec un matériel souillé. Ces similitudes avec une protéine prion sont aussi valables pour d'autres protéines liées à des maladies neurodégénératives : Tau et A β (Prusiner, 2013; Goedert, 2015; Melki, 2018a). En effet, A β sous forme agrégée est décrite comme causant les plaques amyloïdes de la maladie Alzheimer. Pour la protéine Tau, des extraits purifiés sont capables d'induire des dégénérescences neurofibrillaires, avec la présence de filaments hélicoïdaux de type Alzheimer dans des modèles animaux. L'épissage alternatif de l'ARNm de Tau permet la synthèse de six isoformes de la protéine (Fig. 16). Les formes 3R sont retrouvées agrégées dans la maladie de Pick, alors que les formes 4R sont retrouvées dans la paralysie supranucléaire progressive. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les formes 3R et 4R sont retrouvées en quantités égales (Tab. 5).

J'ai déterminé l'efficacité de différents agents à détacher et inactiver des assemblages protéiques présents sur des surfaces de natures distinctes, représentatives des matériels utilisés en laboratoire. Je me suis particulièrement intéressé aux assemblages amyloïdes suivants :

- Les quatre principales souches d' α -synucléine que nous sommes capables de produire en laboratoire à partir de protéine recombinante : les " fibres ", les " rubans ", les " fibres 9.1 " et les " fibres 6.5 ".
- Les assemblages de la protéine Tau constitués des deux isoformes prédominants : 1N3R et 1N4R.
- Les assemblages du peptide β -amyloïde 1-42.

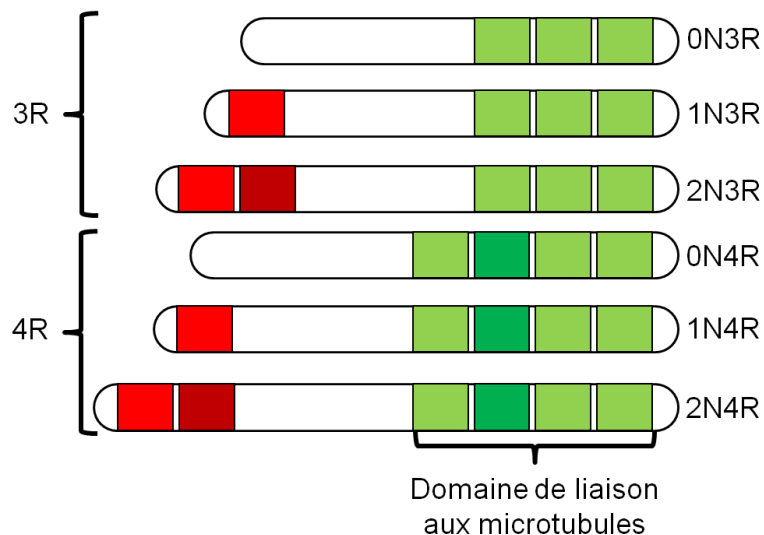


Figure 16 : Schéma des différents isoformes de la protéine Tau issus d'un épissage alternatif. En rouge clair et foncé sont affichées les séquences des régions N. En vert clair et foncé sont affichées les séquences des régions R. Le nom des différents isoformes est donné à droite.

Tableau 5 : Relation entre les différentes tauopathies et la nature de l'isoforme de la protéine Tau retrouvée dans les agrégats.

Tauopathie	Isoforme prédominant
Paralysie supranucléaire progressive	
Maladie des grains argyrophiles	4R
Dégénérescence cortico-basale	
Parkinsonisme post-encéphalitique	3R et 4R
Maladie d'Alzheimer	
Maladie de Pick	3R

Même si l'aspect prion de chacune de ces protéines reste une hypothèse, il est nécessaire, par mesure de précaution, de s'assurer que tous les équipements peuvent être nettoyés afin d'éviter toute exposition à ces assemblages potentiellement dangereux. Quelques travaux ont déjà été menés pour mettre en avant des procédures de décontamination de ces assemblages amyloïdes (Thomzig et al., 2014; Bousset et al., 2016; Hughson et al., 2016; Phan et al., 2018; Tarutani et

al., 2018). Seule l'étude de Bousset *et al.* a été menée sur deux souches différentes d' α -synucléines : les " fibres " et les " rubans ". Pour cela, j'ai repris cette étude en incluant de nouveaux assemblages d' α -synucléine et les assemblages de Tau et d'A β . J'ai testé l'efficacité de nettoyage des agents ayant été utilisés lors des premiers tests d'inactivation soit l'eau seule, des détergents (le SDS, l'Hellmanex et le TFD4), la soude et la guanidine (un dénaturant de protéine). J'ai testé chacun de ces agents pour détacher les assemblages de différentes surfaces souillées (plastique, verre, aluminium et acier) afin de simuler les différents types de matériaux retrouvés dans un laboratoire. J'ai aussi contrôlé les capacités de chacun de ces agents à désassembler et donc inactiver les fibres amyloïdes. Au final, j'ai compilé les données dans un tableau, qui pourra être utilisé comme " check-list " dans tous les laboratoires qui manipulent ces assemblages, afin de connaître la meilleure procédure à adopter pour détacher, et inactiver les fibres amyloïdes selon leurs natures et le matériel à nettoyer.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Assessment of the efficacy of different procedures that remove and disassemble alpha-synuclein, tau and A-beta fibrils from laboratory material and surfaces

Alexis Fenji, Audrey Coens, Tracy Bellande, Ronald Melki & Luc Bousset

α -synuclein fibrillar polymorphs, Tau and A β 1–42 fibrillar assemblies have been shown to propagate, amplify and trigger the formation of protein deposits reminiscent of those present within the central nervous system of patients developing synucleinopathies, tauopathies and amyloid plaques after injection intracerebrally, intramuscularly, intraperitoneally or within the blood stream of model animals. They are thus hazardous and there is need for decontamination and inactivation procedures for laboratory surfaces and non-disposable material. We assessed the effectiveness of different reagents to clean and disassemble potentially pathogenic assemblies adsorbed on non-disposable materials in laboratories. We show that commercial detergents and SDS are way more suited to detach α -synuclein fibrillar polymorphs, Tau and A β 1–42 fibrillar assemblies from contaminated surfaces and disassemble the fibrils than methods designed to decrease PrP prion infectivity. Our observations reveal that the choice of the most adapted cleaning procedure for one given protein assembly or fibrillar polymorph should integrate detergent's cleaning efficiency, material compatibility and capacity to dismantle assemblies. We provide an integrated representation where desorption and neutralization efficacy and surface compatibility are combined to facilitate the choice of the most adapted decontamination procedure. This representation, together with good laboratory practices, contributes to reducing potential health hazards associated to manipulating protein assemblies with prion-like properties.

The proteins alpha-synuclein (α -Syn), Tau and the amyloid peptide A β 1–42 are the principal component of Lewy bodies and neurites, tangles and Paired Helical Filaments (PHF) and amyloid plaques, respectively. These microscopic protein particles are the neuropathological hallmarks of Parkinson's disease and other synucleinopathies and Alzheimer's disease and other tauopathies¹. The monomeric forms of α -Syn, Tau and A β 1–42 form *in vitro* under physiological pH and salt conditions a continuum of oligomeric assemblies ranging from low to high molecular weight protein particles, the largest of which have fibrillar shape². These assemblies, have been shown to propagate, amplify and trigger the formation of protein deposits reminiscent of those present within the central nervous system of patients developing synucleinopathies, tauopathies and amyloid plaques after their take up by cultured cells and/or upon injection within the central nervous system of model animals^{3–34}. α -Syn, Tau and A β 1–42 assemblies were also shown to reach the CNS by crossing for instance the brain blood barrier when injected systemically, intraperitoneally or intramuscularly into model animals^{20,30}. These observations suggest that α -Syn, Tau and A β 1–42 assemblies may contaminate the CNS from peripheral tissues. Thus, α -Syn, Tau and A β 1–42 assemblies need to be considered as potentially hazardous material within the laboratory. Consequently, to minimize the risk associated to exposure of workers in the laboratory to those assemblies it is not only important to develop guidelines for how to best handle those assemblies in the laboratory but also to develop cleaning methods that allow reducing the potential hazard associated to their manipulation.

Paris-Saclay Institute of Neuroscience, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.B. (email: luc.bousset@cns.fr)

Decontamination and inactivation procedures allowing health hazard reduction by a factor 1000 to 10000 have been implemented in the prion field for reusable material. These procedures are based on the use of sodium hypochlorite (20,000 ppm available free chlorine), sodium hydroxide (1 N) and autoclaves (121–134 °C for 1 hour) or a combination of hydrogen peroxide and copper ions^{35–37}. We recently showed that the procedures recommended for reducing the infectivity of prion protein particles are not best suited to clean material contaminated by α -Syn assemblies³⁸. This is certainly due to the fact that protein particles, made of different proteins, have distinct properties. We therefore assessed the ability of a variety of cleaning procedures, including practices established for the infectious form of prion protein, to remove α -Syn, Tau and A β 1–42 assemblies adsorbed on plastic, glass, aluminum or stainless steel surfaces that equip and/or are most commonly used in laboratories. We also evaluated in a quantitative manner the protein assemblies disassembling propensities of those cleaning procedures.

We show here that the cleaning procedure efficiency depends not only on the nature of the protein assembly but also on the structural characteristics of distinct assemblies made of one given protein e.g. polymorphs. Our results strongly suggest that the cleaning procedure needs being adapted to the nature of the contaminated surface. Assessment of the fate of the distinct assemblies and polymorphs that were detached from contaminated surfaces shows that the most efficient cleaning procedures do not necessarily disassemble the assemblies. Thus, the choice of the most adapted cleaning procedure for one given protein assembly or polymorph should integrate the procedure cleaning efficiency and capacity to dismantle assemblies.

Results

Binding of α -Syn, Tau and A β fibrillar assemblies. Distinct α -Syn fibrillar polymorphs, also designated strains, obtained under well-defined assembly conditions (Fig. 1A), Tau fibrils made of Tau 1N3R and 1N4R isotypes (Fig. 1B) and A β 1–42 fibrils (Fig. 1C) were generated, labeled with Atto-550 succinimidyl ester and spotted on strips made of plastic, glass, stainless steel, or aluminum. To better mimic the conditions encountered in laboratories where the surfaces are not necessarily smooth, all surfaces were pre-treated with sandpaper to make the surface rougher, increase the attachment of the material and diminish elimination by gentle wiping. To further mimic what may happen in a laboratory after surfaces contamination, droplets containing α -Syn, Tau and A β fibrillar assemblies were allowed to dry overnight at room temperature. The different fibrillar assemblies adhered to the distinct surfaces and the spots were clearly visible by eye or by fluorescence (Fig. 1D).

Cleaning procedure. The washing procedure consisted of immersing the contaminated surfaces in washing solutions of different compositions under gentle agitation on an orbital shaker as described in the methods section. The surfaces were washed with MilliQ water, dried and the amount of assemblies that remained after washing (Fig. 2) was quantified by fluorescence measurements. The cleaning solution may disassemble the fibrillar assemblies detached from the surfaces to different extents. In the case no disassembly occurs within the cleaning solution, the latter needs to be handled as a biohazard while no such requirement is needed in the case of complete disassembly. We therefore assessed the amount of α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies remaining after 1 hour treatment in the cleaning solutions following centrifugation (Fig. 3).

Quantitative assessment of the cleaning efficacy of different washing solutions. The amount of α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies that remained attached to the different surfaces after washing with each one of the following solutions: (i) MilliQ water; (ii) SDS (1%); (iii) Hellmanex II (1%); (iv) TFD4 (1%); (v) guanidinium hydrochloride (6 M) and (vi) NaOH (1 M) was determined by measuring the amount of fluorescent α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies remaining on the contaminated surfaces (Fig. 2). The total amount of the different α -Syn fibrillar polymorphs, Tau 1N3R, 1N4R and A β fibrils spotted initially on the different surfaces was arbitrarily set to 100%. The amount of α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies remaining on the different surfaces after the washing step, represented by the measured fluorescence intensity, was expressed relative to the initial 100% fluorescence intensity of each fibrillar assembly. The washing solutions did not affect the fluorescence of the ATTO-550 dye after the washing step (Figure S1). Fibrillar assemblies made of different proteins were removed by the different cleaning solutions with different efficiencies. Indeed, while the proportion of α -Syn and A β fibrils remaining on glass surfaces was undetectable upon cleaning with 1% Hellmanex in MilliQ water, that of Tau fibrils was 10 to 20%. Similarly, while the proportion of α -Syn fibrillar polymorph “fibrils” remaining on glass surfaces was undetectable upon cleaning with 1% SDS in MilliQ water, that of the α -Syn fibrillar polymorphs “ribbons” was nearly 20%. Finally, while the proportion of α -Syn fibrillar polymorph “fibrils” remaining on stainless steel surfaces was undetectable upon cleaning with 1% SDS in MilliQ water, that of the same fibrillar polymorph on aluminum surfaces was 60%. We conclude from these measurements that the cleaning solutions need to be adapted not only to the nature of the fibrillar protein assemblies but also to the fibrillar polymorph and the nature of the contaminated material. Similar results were obtained for Tau and A β fibrils. SDS (1% in MilliQ water) allowed the desorption of over 99% of Tau 1N3R, 1N4R and A β fibrils from glass, outranking the cleaning efficacy of Hellmanex and TFD4 (1% in MilliQ water), the proportion of fluorescent fibrils remaining on aluminum surfaces after cleaning with SDS was 37 ± 5%. Overall, the commercial detergent Hellmanex (1% in MilliQ water), was most efficient for cleaning all surfaces (Fig. 2). The commercial detergent TFD4 (1% in MilliQ water) and SDS (1% in MilliQ water) performed well except for aluminum surfaces for SDS and plastic surfaces for TFD4. Sodium hydroxide (1N in MilliQ water) performed well except for plastic and stainless steel surfaces. It is worth noting that NaOH, Hellmanex and TFD4 corrode aluminum surfaces (Figure S2).

Quantitative assessment of the fate of α -Syn, Tau and A β fibrillar polymorphs. To determine the fate of desorbed α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies, in particular whether they

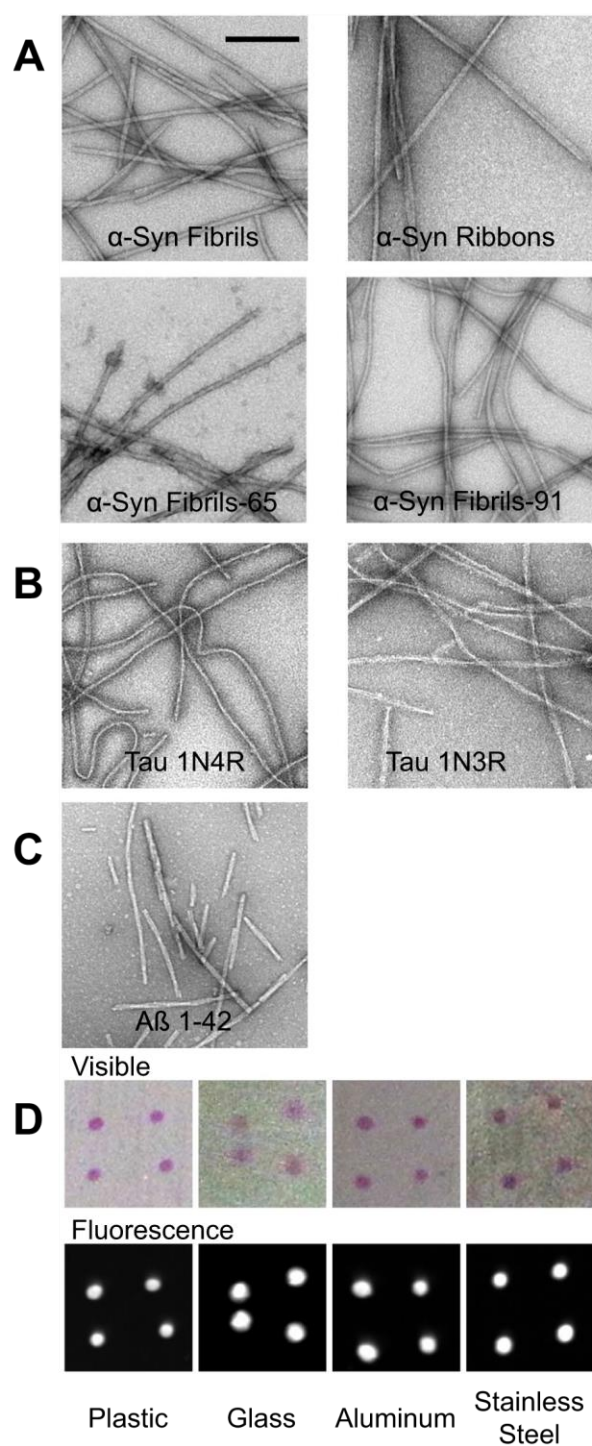


Figure 1. Fibrillar assemblies and experimental setup (A–C) electron micrographs of fibrillar assemblies. α -Syn fibrillar polymorphs (A), Tau fibrillar assemblies 1N3R or 1N4R (B), and A β 1–42 peptide fibrils (C). Representative images of the different plates used throughout the present study after spotting and drying 4 droplets of α -Syn fibrils labeled with Atto 550 imaged in visible light and by fluorescence (D). Scale bar, 200 nm.

remain fibrillar or disassemble into low molecular weight species in the washing solutions, the different assemblies were incubated with the cleaning solutions used to clean plastic, glass, steel, or aluminum in this study for 1 h at room temperature and subjected to ultracentrifugation. The amount of non-fibrillar, fluorescent α -Syn, in the supernatant of the different solutions used throughout this study, expressed as the fraction of the initial fibrillar assemblies before centrifugation, was quantified (Fig. 3). All α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies remained of fibrillar nature in MilliQ water as assessed by ultracentrifugation. Overall, SDS

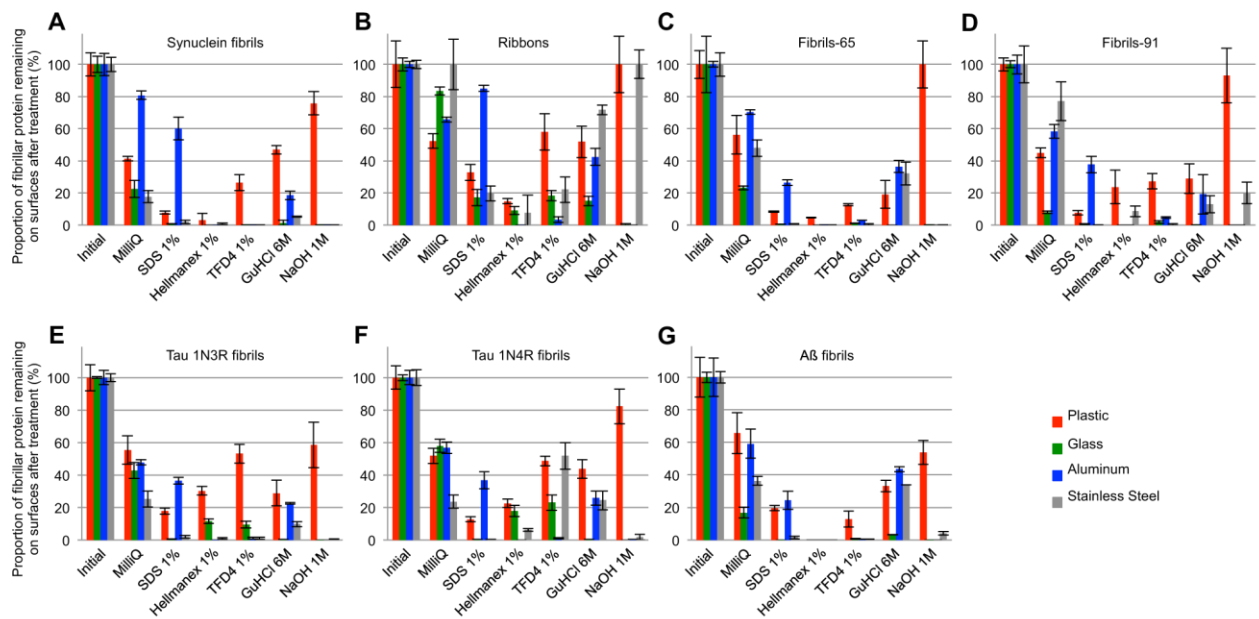


Figure 2. Efficiency of different cleaning solutions to remove amyloid fibrillar assemblies from plastic, glass, aluminum and stainless steel surfaces. Quantification of the remaining Atto-550 labeled fibrillar α -Syn polymorph “fibrils” (A), “ribbons” (B), “fibrils-65” (C), “fibrils-91” (D), Tau 1N3R fibrils (E), Tau 1N4R fibrils (F) and A β fibrils (G) spotted and dried on plastic (red), glass (green), aluminum (blue) and stainless steel (grey) surfaces, previously scraped with sandpaper, using a fluorescence imager after cleaning with the different solutions. Error bars represent standard error (SE) (n = 4 independent measurements) performed in quadruplicates.

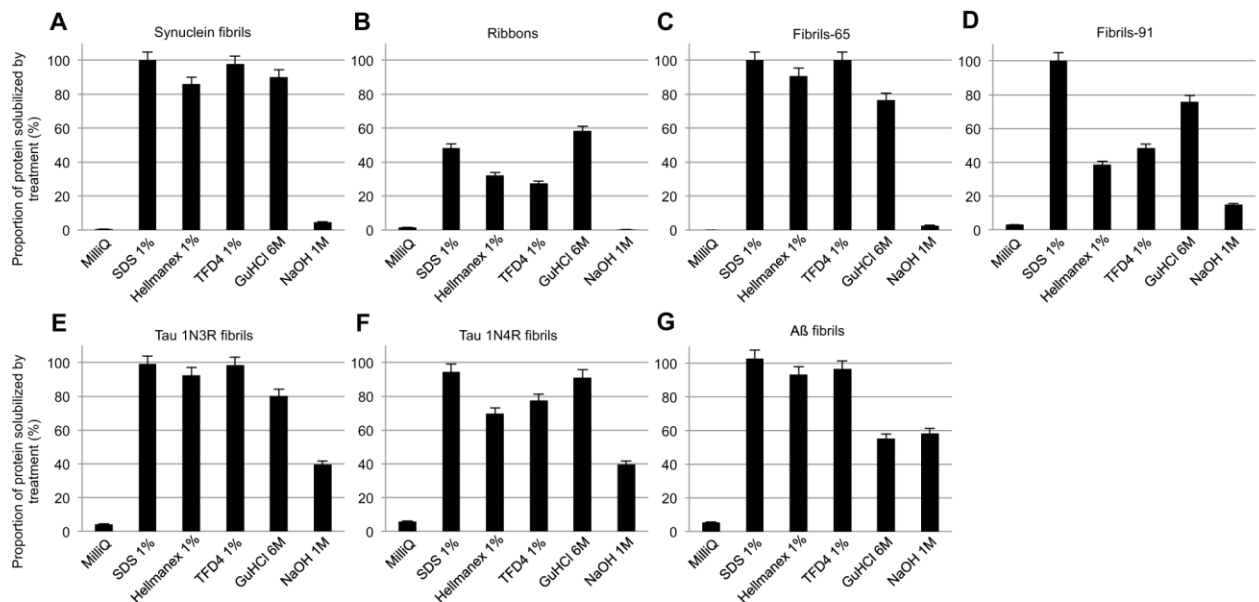


Figure 3. Quantitative assessment of the fraction of non-fibrillar Atto-550 labeled α -Syn, Tau and A β in the different cleaning solutions. The fraction (%) of the α -Syn fibrillar polymorphs “fibrils” (A), “ribbons” (B), “fibrils-65” (C), “fibrils-91” (D), Tau 1N3R fibrils (E), Tau 1N4R fibrils (F) and A β fibrils (G), that becomes soluble in the cleaning solution was determined following ultracentrifugation by measurement of the absorbance of fluorescently labeled protein in the supernatant fraction as described in the material and methods section. Error bars represent standard error (SE) (n = 4 independent measurements) performed in quadruplicates.

(1% in MilliQ water), was most efficient for disassembling fibrillar Tau, A β and α -Syn fibrillar polymorphs. The α -Syn fibrillar polymorph “ribbons” resisted most to SDS-mediated disassembly. The commercial detergents Hellmanex and TFD4 performed relatively well except for α -Syn fibrillar polymorph “ribbons” and “fibrils-91”. Sodium hydroxide (1 N in MilliQ water) did not disassemble efficiently α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies. Finally, Guanidine hydrochloride (6 M in MilliQ water) performed best for the α -Syn fibrillar polymorph “ribbons” with $58 \pm 3\%$ disassembly. We conclude from these measurements that the cleaning solutions need to be adapted to the nature of the fibrillar protein assemblies and to the fibrillar polymorphs.

Overall efficacy of the different cleaning strategies. Taken together, our measurements demonstrate that SDS, TFD4 and Hellmanex (1% in MilliQ water) are overall the most efficient cleaning procedures as they detach and disassemble α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies to the highest extent and to a level where they become undetectable by the method used here (Figs 2 and 3). MilliQ water and sodium hydroxide (1 N in MilliQ water) appear the least efficient cleaning procedures (Figs 2 and 3). As the cleaning solutions need to be adapted to the nature of the fibrillar protein assemblies, the fibrillar polymorphs and to the nature of the contaminated surface, we combined the desorption and neutralization efficacy of each treatment into a unique representation (Fig. 4). This representation allows choosing the most suitable cleaning reagents for removal and neutralization of α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies as a function of the contaminated surface nature at a glance (Fig. 4).

Discussion

None of the fibrillar assemblies listed and used in this work has been demonstrated to be infectious in humans. Nonetheless, combining decontamination and inactivation procedures for reusable material and surfaces with laboratory standard operating procedures for protein assemblies with prion-like properties (Table 1) allows reducing putative health hazards associated to manipulating such protein assemblies in laboratories by a very significant factor exceeding 1000 to 10000 fold. We previously showed that methods designed to decrease PrP prion infectivity that are based on the use of sodium hypochlorite (20,000 ppm available free chlorine), sodium hydroxide (1 N) and autoclaves (121–134 °C for 1 hour) or a combination of hydrogen peroxide and copper ions^{35–37} neither effectively remove a well-defined α -Syn fibrillar polymorphs adsorbed to different materials commonly used in the laboratory nor disassemble it with efficiency. This is certainly due to the fact that protein particles, made of different proteins, have distinct properties. The aim of this work was to expand the previous work and to establish a decontamination and inactivation procedure for several other protein assemblies and fibrillar polymorphs/strains that have been reported to act as seeds in model animals as they trigger the aggregation of endogenous like proteins.

We assessed the effectiveness of different commercially available cleaning solutions to remove and dismantle distinct α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies following their adsorption on plastic, glass, aluminum or stainless steel surfaces that are most commonly used in laboratories. The results we report show unequivocally the need to adapt the cleaning procedure to the nature of the fibrillar protein assemblies and the fibrillar polymorphs. Indeed, the cleaning procedure efficiency appears to depend on the nature of the protein assembly and the structural characteristics of distinct assemblies made of one given protein e.g. polymorphs/strains. Our results also reveal that the nature of the contaminated surface strongly influences the cleaning procedure efficacy. Our measurements show that the most efficient desorption procedures do not necessarily dismantle distinct assemblies and polymorphs. Finally, our assessment reveals incompatibilities between certain detergents and surfaces. Thus, the choice of the most adapted cleaning procedure for one given protein assembly or polymorph should integrate detergent’s cleaning efficiency, compatibility with the contaminated surface and capacity to dismantle assemblies.

Overall three cleaning procedures relying on the use of commercially available detergents, SDS, TFD4 and Hellmanex (1% in MilliQ water) effectively removed from non-disposable plastic, glass, aluminum and stainless steel laboratory tools and disassembled distinct α -Syn fibrillar polymorphs, Tau and A β fibrillar assemblies. While very efficient in removing and disassembling proteins assemblies with prion-like properties, the detergents TFD4 and Hellmanex corroded aluminum surfaces (Figure S2). They thus appear not to be adequate for decontaminating non-disposable laboratory tools made of aluminum. A unique representation (Fig. 4) where different cleaning procedures desorption and neutralization efficacies and compatibility with the contaminated surfaces are combined is given to facilitate the choice of the most suitable and efficient decontaminating procedure. This representation contributes to reducing potential health hazards associated to manipulating protein assemblies with prion-like properties in laboratories.

It is worth noting that cleaning was achieved throughout this study by immersing the contaminated surfaces in washing solutions of different compositions under gentle agitation. Wiping the contaminated surfaces following their exposure to the cleaning solutions with inactivation solution and disposable tissues improves decontamination while generating additional waste.

Methods

Reagents used for decontamination. The following reagent were used in this studies: 10% SDS solution (Euromedex # EU0760), Hellmanex II (Hellma #500300.11-F10W), TFD4 (Franklab), NaOH (Euromedex # 21162), MilliQ water (Millipore using a “Milli-Q® Reference”), Guanidine hydrochloride (Sigma, #509501KG).

Preparation of protein assemblies. *Expression and purification of protein.* The expression and purification of human wild-type α -Syn was performed as previously described³⁹. For Tau 1N3R and Tau 1N4R, full-length human Tau1N3R or Tau 1N4R cDNA was cloned in the pET14b vector. hTau (Tau1N3R or Tau 1N4R) was expressed in E. coli BL21 DE3 CodonPlus cells (Stratagene). Cells were grown in LB medium to an optical density at 600 nm

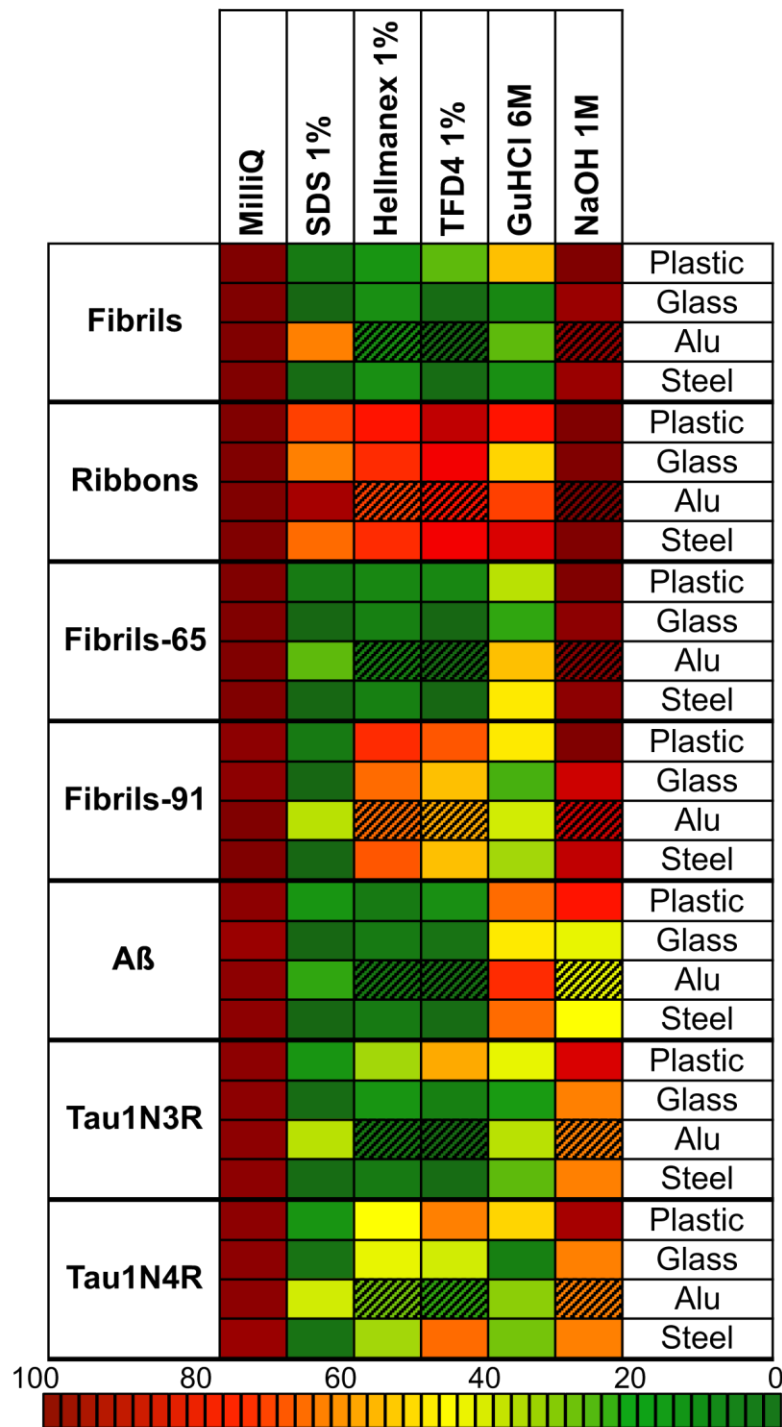


Figure 4. Combined representation of the cleaning procedures desorption and neutralization efficacies and compatibility with the contaminated surfaces. This representation combines the desorption and fibrils disassembly efficiency of each experimental treatment and the compatibility of the treatment with the nature of the surfaces. Colors spanning from brown (high) to dark green (low) integrate the proportion of material remaining adsorbed and of fibrillar nature. Hatched boxes indicate that the treatment corrodes the surface.

of 0.8 absorbance units. hTau expression was induced with 0.5 mM IPTG for 3 h. The cells were then harvested by centrifugation (4000 g, 10 min). The bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM MES pH 6.8, 500 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.2 mM MgCl₂, 5 mM di-thiothreitol, 1 mM PMSF + 1 tablet of Complete (Roche)) per liter and lysed by sonication. Cell extracts were clarified by centrifugation at 14,000 g, 30 min. The lysate was heated to 80°C for 20 min and centrifuged at 14,000 g for 30 min. The supernatant was dialyzed against 100 volumes of buffer A (20 mM MES pH 6.8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF) at 4°C. The dialyzed protein

Recommendations:		
Step	Do	Do NOT
General	Use appropriate personal protective equipment: - Laboratory coat - Gloves - Goggles/safety glasses - Mechanical filter respirators such as FFP2 particulate respirator mask, brand 3 M ref #8822 - Prefer disposable supplies	- Eat or drink in an environment where α -Syn fibrillar strains, Tau and A β fibrillar assemblies are used
Purification	- Keep the concentration of α -Syn fibrillar strains, Tau and A β fibrillar assemblies below 1 mM - Maintain pH > 6.5 to avoid spontaneous assembly for α -Syn and < 8 for Tau - Aliquot α -Syn, Tau and A β upon purification (1 to 5 mg per fraction)	- Concentrate α -Syn, Tau and A β above 1 mM - Sonicate continuously α -Syn, Tau and A β solution above 5 min
Fibrillization	- Use the minimal amount of α -Syn fibrillar strains, Tau and A β fibrillar assemblies needed for the experiment - Assemble in sealed tubes - Sonicate in closed/sealed tubes using appropriated apparatus such VialTweeter or cup-horn sonotrode. - Operate under a PSM2 if working with open tubes/vials	- Sonicate in open containers. This generates aerosol containing α -Syn fibrillar strains, Tau and A β fibrillar assemblies that conceivably might reach the brain through the olfactory epithelium or the gut following inhalation and swallowing.
Storage	- Keep fibrils in closed tubes and discard in biohazard container immediately after use. - Keep α -Syn fibrillar strains, Tau and A β fibrillar assemblies in solution	- Do not dry any fibrillar assembly on any surfaces, as this renders them more resistant to detergent solubilization/inactivation.
Inactivation	- Inactivate samples and contaminated surfaces with 1% SDS or commercial inactivation solutions for 1 hours at room temperature - Discard inactivated samples with limited volume (e.g. less than 100l) in Biohazard waste container	- Do not use MilliQ water, NaOH or Sodium Hypochlorite
Recommendations:		
α -Syn fibrillar strains, Tau and A β fibrillar assemblies waste	Inactivation	
Fibrillar strains and assemblies in solution	Dilute the solution 10 folds in inactivation solution Incubate 1 h at room temperature Discard in biohazard waste SDS (1% in MilliQ water is best suited for all strains and assemblies except α -Syn ribbons where Guanidine hydrochloride, 6 M, is slightly more efficient)	
Surfaces contaminated with fibrillar strains and assemblies	Immerse completely in inactivation solution Incubate 1 h at room temperature under gentle shaking Rinse with water Discard inactivation solution in biohazard waste If the surface is a bench, wipe with inactivation solution, discard tissues in solid biohazard waste.	

Table 1. Laboratory Standard Operating Procedures for fibrillar protein assemblies with prion-like properties.

mixture was loaded on an SP Sepharose column (60 ml bed volume). Proteins were separated with a linear gradient of 0 to 100% buffer B (20 mM MES pH 6.8, 1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF). Fractions were analyzed via SDS-PAGE stained with Coomassie blue. Fractions containing hTau were pooled and dialyzed against 100 volumes of PBS buffer containing 1 mM DTT. The hTau concentration was determined spectrophotometrically using an extinction coefficient at 280 nm of 7450 M⁻¹·cm⁻¹ for Tau 1N3R and 7575 M⁻¹·cm⁻¹ for Tau 1N4R. A β 1–42 peptides (sequence DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIL) were bought from GeneCust (Dudelange, Luxembourg). A β 1–42 was solubilized in HFIP (Sigma, #52517–10 mL) and kept at –20 °C after evaporation of HFIP.

Aggregation of protein into amyloid fibrils. α -Syn was incubated in buffer A to obtain the fibrillar polymorph “fibrils” (50 mM Tris–HCl, pH 7.5, 150 mM KCl), in buffer B for “ribbons” (5 mM Tris–HCl, pH 7.5), in buffer C for “fibril-65” (20 mM MES pH6.5, 150 mM NaCl) and in buffer D for “fibril-91” (20 mM KPO₄ pH9.1), at 37 °C under continuous shaking in an Eppendorf Thermomixer set at 600 r.p.m for 4–7 days^{16,40}.

Fibrillation of human Tau was achieved at 40 μ M in the presence of 10 μ M heparin by shaking 0.5 ml solution aliquots at 37 °C in an Eppendorf Thermomixer set at 600 rpm for 4 days.

A β fibrillation was achieved at 500 μ M in PBS (Sigma, #D8537) at 37 °C under continuous shaking in an Eppendorf Thermomixer set at 600 r.p.m for 4 days.

Labeling of fibrils. All amyloid fibrils were centrifuged twice at 15,000 g for 10 min and resuspended twice in PBS at 1.446 g/L. All preformed assemblies were labeled with Atto-550 NHS-ester (Atto-Tec GmbH # AD 550–35) fluorophore following the manufacturer’s instructions using a protein:dye ratio of 1:2. The labeling reactions were arrested by addition of 1 mM Tris pH 7.5. The unreacted fluorophore was removed by a final cycle of two centrifugations at 15,000 g for 10 min and resuspensions of the pellets in PBS.

Spotting of fibrillar α -Syn, tau and A-beta on different surfaces. Plastic slides (PVC), glass (Glass slides for microscopy, Sigma # S8400-1PAK), aluminum and stainless steel plates (2 × 20 × 60 mm) were pre-treated with sandpaper (grit size P1000) to make the surfaces rougher. 2 μ l, containing 1 μ g of the different fibrillar assemblies, were spotted on the different surfaces and allowed to dry over night at room temperature in the dark.

Cleaning procedure. Slides and plates were incubated fully immersed in a petri dish containing 10 ml of washing solution (MilliQ water, SDS (1%), NaOH 1 N, Hellmanex II (1%), TFD4 (1%), guanidine 6 M), under gentle agitation on an orbital shaker (set at 50 rpm) at room temperature for 1 hour. Slides and plates were removed, washed in Petri dishes containing 10 ml of MilliQ under the same agitation conditions. Finally slides and plates were recovered and allowed to dry over night at room temperature in the dark.

Quantification of assemblies. *Fluorescence measurements.* Fibrils were detected directly on the slides and plates through Atto-550 fluorescence using a ChemiDoc™ MP (BioRad) and the protocol DyLight 549. Acquisition was performed using the protocol « Signal Acquisition Mode » from 0.002 sec to 2 sec of exposition. Images were processed and quantified using Image Lab, briefly, the fluorescence intensity of each spot was integrated using round in « Volume Tool » with a fixed diameter. The background was measured on a neighboring area and subtracted. The proportion of remaining protein was calculated for each spot as the fluorescence intensity after cleaning divided by the initial fluorescence intensity.

Inactivation assay. α -Syn, tau and A β fibrillar assemblies (25 μ g) were dried in 500 μ l polycarbonate tubes. The different cleaning solutions were added (200 μ l) and the tubes were incubated at room temperature for 1 h. The tubes were next subjected to ultracentrifugation (100,000 g for 40 min at 20 °C in a tabletop TL100 ultra centrifuge using a TLA120.1 rotor). The absorbance at 550 nm of the different fibrils diluted in the different cleaning solutions and of the supernatant after centrifugation were recorded using an HP 8453 UV-Vis spectrophotometer (Hewlett Packard).

References

- Goedert, M. Neurodegeneration. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science* **349**, 1255555 (2015).
- Melki, R. How the shapes of seeds can influence pathology. *Neurobiol. Dis.* **109**, 201–208 (2018).
- Brundin, P., Melki, R. & Kopito, R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 301–307 (2010).
- Clavaguera, F. *et al.* Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* **11**, 909–913 (2009).
- Guo, J. L. *et al.* Unique pathological tau conformers from Alzheimer's brains transmit tau pathology in nontransgenic mice. *J. Exp. Med.* **213**, 2635–2654 (2016).
- Kaufman, S. K. *et al.* Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability *In Vivo*. *Neuron* **92**, 796–812 (2016).
- Narasimhan, S. *et al.* Pathological tau strains from human brains recapitulate the diversity of tauopathies in non-transgenic mouse brain. *J. Neurosci.* **37**, 11406–11423 (2017).
- Sanders, D. W. *et al.* Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* **82**, 1271–1288 (2014).
- Carlson, G. A. *et al.* Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nat. Commun.* **6**, 8490 (2015).
- Wegmann, S., Nicholls, S., Takeda, S., Fan, Z. & Hyman, B. T. Formation, release, and internalization of stable tau oligomers in cells. *J. Neurochem.* **139**, 1163–1174 (2016).
- Woerman, A. L. *et al.* Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy patients propagate in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, E8187–E8196 (2016).
- Danzer, K. M., Krebs, S. K., Wolff, M., Birk, G. & Hengerer, B. Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *J. Neurochem.* **111**, 192–203 (2009).
- Desplats, P. *et al.* Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 13010–13015 (2009).
- Luk, K. C. *et al.* Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 20051–20056 (2009).
- Volpicelli-Daley, L. A. *et al.* Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy Body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* **72**, 57–71 (2011).
- Bousset, L. *et al.* Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* **4**, 2575 (2013).
- Luk, K. C. *et al.* Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J. Exp Med* **209**, 975–986 (2012).
- Luk, K. C. *et al.* Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* **338**, 949–953 (2012).
- Mougenot, A. L. *et al.* Prion-like acceleration of a-synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging* **33**, 2225–2228 (2012).
- Peelaerts, W. *et al.* alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* **522**, 340–344 (2015).
- 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).
- Watts, J. C. *et al.* Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 19555–19560 (2013).
- Shimozawa, A. *et al.* Propagation of pathological alpha-synuclein in marmoset brain. *Acta Neuropathol Commun* **5**, 12 (2017).
- Eisele, Y. S. *et al.* Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science* **330**, 980–982 (2010).
- Iba, M. *et al.* Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *J. Neurosci.* **33**, 1024–1037 (2013).
- Meyer-Luehmann, M. *et al.* Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* **313**, 1781–1784 (2006).
- Stohr, J. *et al.* Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (Abeta) prions. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 11025–11030 (2012).
- Masuda-Suzukake, M. *et al.* Prionlike spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* **136**, 1128–1138 (2013).
- Rey, N. L. *et al.* Widespread transneuronal propagation of alpha-synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *J. Exp Med* **213**, 1759–1778 (2016).
- Sacino, A. N. *et al.* Intramuscular injection of a-synuclein induces CNS alpha-synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 10732–10737 (2014).
- Novotny, R. *et al.* Conversion of Synthetic A β to *In Vivo* Active Seeds and Amyloid Plaque Formation in a Hippocampal Slice Culture Model. *J. Neurosci.* **36**, 5084–93 (2016).

32. Bolmont, T. *et al.* Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am J Pathol.* **171**, 2012–20 (2007).
33. Clavaguera, F. *et al.* M. Peripheral administration of tau aggregates triggers intracerebral tauopathy in transgenic mice. *Acta Neuropathol.* **127**, 299–301 (2014).
34. Clavaguera, F. *et al.* Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 9535–40 (2013).
35. Ernst, D. R. & Race, R. E. Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J Virol Methods* **41**, 193–202 (1994).
36. Race, R. E. & Raymond, G. J. Inactivation of transmissible spongiform encephalopathy (prion) agents by Environ LpH. *J Virol* **78**, 2164–2165 (2004).
37. Solassol, J., Pastore, M., Crozet, C., Perrier, V. & Lehmann, S. A novel copper-hydrogen peroxide formulation for prion decontamination. *J Infect Dis* **194**, 865–869 (2006).
38. Bousset, L., Brundin, P., Böckmann, A., Meier, B. & Melki, R. An Efficient Procedure for Removal and Inactivation of Alpha-Synuclein Assemblies from Laboratory Materials. *J Parkinsons Dis.* **6**, 143–151 (2016).
39. Ghee, M., Melki, R., Michot, N. & Mallet, J. PA700, the regulatory complex of the 26S proteasome, interferes with alpha-synuclein assembly. *FEBS J* **272**, 4023–4033 (2005).
40. Makky, A., Bousset, L., Polesel-Maris, J. & Melki, R. Nanomechanical properties of distinct fibrillar polymorphs of the protein α -synuclein. *Sci Rep.* **6**, 37970 (2016).

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and grants from the Agence Nationale de la Recherche and the EC Joint Programme on Neurodegenerative Diseases (JPND-NeuTARGETs-ANR-14-JPCD-0002-02; JPND-SYNACTION-ANR-15-JPWG-0012-03), the Institut de France-Fondation Simone et Cino Del Duca, The Fondation Pour La Recherche Médicale (contract DEQ. 20160334896), the Fondation de France (contract 2015-00060936), a “Coup d’Elan a la Recherche Francaise” award from Fondation Bettencourt-Schueller and the European Union’s Horizon 2020 research program (grant 116060 - IMPRIND - H2020-JTI-IMI2–2015-07). We thank I2BC facility for access to Electron Microscopes (JEOL 1200 and Technai 120). We acknowledge Patrick Parra for helping us preparing the slides and plates used in the study.

Author Contributions

L.B. and R.M. designed the study; A.F. performed experiments and analyzed data; A.C. and T.B. contributed reagents; L.B., A.F. and R.M. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28856-2>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Assessment of the efficacy of different procedures that remove and disassemble alpha-synuclein, tau and A-beta fibrils from laboratory material and surfaces

Supplementary Data

Alexis Fenyi, Audrey Coens, Tracy Bellande, Ronald Melki, Luc Bousset

Paris-Saclay Institute of Neuroscience, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Address correspondence to R. Melki, ronald.melki@cnr.fr; Tel. +33169823503; Fax. +33169823447

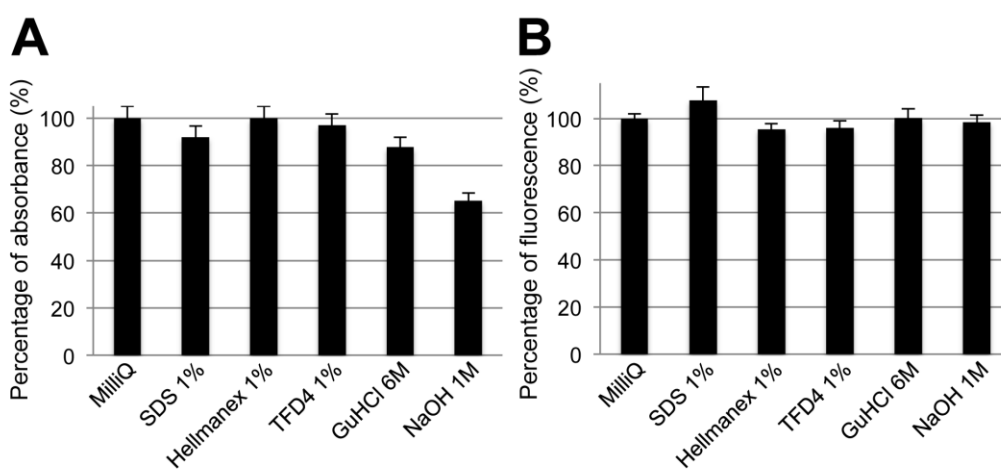


Figure S1. Atto550 absorbance and fluorescence in cleaning solutions. The absorbance (A) of Atto550 (10 μ M) at 550nm was measured in the different cleaning solutions. The result is adjusted to the absorbance at 680nm and expressed as the fraction of Atto550 absorbance in MilliQ water. The fluorescence (B) of Atto 550 (10 μ M) at 575nm upon excitation at 555nm in the different cleaning solutions was recorded. The fluorescence is expressed as the fraction of Atto550 fluorescence in MilliQ water.

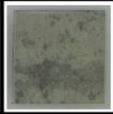

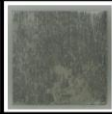



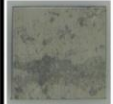





	MiliQ	SDS 1%	Hellmanex 1%	TFD4 1%	GaHCl 6M	NaOH 1M
Before treatment						
After treatment						

Figure S2. Effect of the different cleaning solutions on aluminum plates. The aluminum plates were photographed before and after been immersion for 1 hour in the indicated cleaning solution under gentle agitation.

III. Etude de la propagation de différents assemblages d' α -synucléine dans un réseau de neurones corticaux induits

La théorie de Braak, sur la propagation des assemblages dans le système nerveux central, présuppose un passage des agrégats pathologiques, de cellule à cellule, le long des réseaux de neurones. Il est donc important de comprendre la propagation des agrégats de neurone en neurone. Des études récentes ont montré la capacité de propagation des assemblages chez l'animal (souris, rats, singes), ou dans des cellules en culture (lignées cellulaires ou cultures primaires de rat ou de souris). Cependant, toutes ces études ont l'inconvénient de ne pas refléter au mieux ce qu'il se passe chez les patients (protéome d'une autre espèce ou d'un autre type cellulaire). A l'inverse, j'ai pu participer à une étude portant sur la propagation des agrégats d' α -synucléine, dans un réseau de neurones humains issus de cellules pluripotentes en culture. Ce réseau a été reconstitué grâce aux micro-canaux de chambres de culture dites " micro fluïdique ", et a permis de simuler des connexions neuronales cortico-corticales humaines. Cette étude a permis de démontrer les capacités de propagation d'assemblages d' α -synucléine de neurone en neurone, ce qui implique l'entrée des agrégats, le transport actif le long des axones, et une transmission vésiculaire ou non des particules d'une cellule à l'autre. Deux types d'assemblages d' α -synucléine ont été étudiés pour identifier s'il existe des déterminants moléculaires qui affectent le mécanisme de propagation. Ainsi, j'ai été chargé de caractériser les assemblages qui ont été utilisés afin d'être sûr que ceux-ci correspondaient bien aux " fibres " et " rubans " d' α -synucléine originellement décrits.

Propagation of α -Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network

Simona Gribaudo,^{1,2,6} Philippe Tixador,^{3,6} Luc Bousset,^{4,6} Alexis Fenyi,⁴ Patricia Lino,^{1,2} Ronald Melki,^{4,7,*} Jean-Michel Peyrin,^{3,5,7,*} and Anselme L. Perrier^{1,2,7,*}

¹INSERM U861, I-STEM, AFM, Corbeil-Essonnes 91100, France

²UEVE U861, I-STEM, AFM, Corbeil-Essonnes 91100, France

³Sorbonne Universités, Faculté des Sciences et Ingénierie, CNRS/UMR 8256, B2A, Biological Adaptation and Ageing, Institut de Biologie Paris Seine, Paris 75005, France

⁴Laboratory of Neurodegenerative Disease, Institut François Jacob, MIRCen, CEA-CNRS, Fontenay aux Roses 92265, France

⁵Sorbonne Universités, Faculté des Sciences et Ingénierie, CNRS UMR 8246, INSERM U1130, Neurosciences Paris Seine, Institut de Biologie Paris Seine, Paris, 75005, France

⁶Co-first author

⁷Co-senior author

*Correspondence: ronald.melki@cns.fr (R.M.), jean-michel.peyrin@upmc.fr (J.-M.P.), anselme.perrier@inserm.fr (A.L.P.)
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.007>

SUMMARY

Reappraisal of neuropathological studies suggests that pathological hallmarks of Alzheimer's disease and Parkinson's disease (PD) spread progressively along predictable neuronal pathways in the human brain through unknown mechanisms. Although there is much evidence supporting the prion-like propagation and amplification of α -synuclein (α -Syn) *in vitro* and in rodent models, whether this scenario occurs in the human brain remains to be substantiated. Here we reconstructed in microfluidic devices corticocortical neuronal networks using human induced pluripotent stem cells derived from a healthy donor. We provide unique experimental evidence that different strains of human α -Syn disseminate in "wild-type" human neuronal networks in a prion-like manner. We show that two distinct α -Syn strains we named fibrils and ribbons are transported, traffic between neurons, and trigger to different extents, in a dose- and structure-dependent manner, the progressive accumulation of PD-like pathological hallmarks. We further demonstrate that seeded aggregation of endogenous soluble α -Syn affects synaptic integrity and mitochondria morphology.

INTRODUCTION

Chronic neurodegenerative diseases are tightly linked to the progressive accumulation of abnormally folded protein conformers inside or outside neurons. These abnormal conformers are proposed to mediate neuronal dysfunctions. In synucleinopathies such as Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB), and multiple system atrophy (MSA), α -synuclein (α -Syn), a presynaptic protein involved in the regulation of synaptic vesicle release, accumulates in a phosphorylated and insoluble form in neurons. Aggregated α -Syn is the principal component of Lewy bodies and Lewy neurites, which are considered pathognomonic hallmarks of synucleinopathies (Goedert et al., 2013; Spillantini et al., 1997). As in Alzheimer's disease (Braak et al., 2006), PD/DLB/MSA pathological hallmarks progress spatially and temporally in the brains of affected patients (Braak et al., 2003b). This, together with the observation that Lewy bodies are detected in neurons grafted in PD patients (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008), suggests that neuropathological hallmarks spread from diseased to naive neurons through unknown mechanisms.

Mounting studies show that α -Syn assemblies trigger the aggregation of soluble α -Syn both *in vitro* and *in vivo*, suggesting that aggregated α -Syn holds prion-like properties in rodents (Desplats et al., 2009; George et al., 2013; Guo

et al., 2013; Hansen et al., 2011; Luk et al., 2012a; Peelaerts et al., 2015; Sacino et al., 2014a; Volpicelli-Daley et al., 2011). Indeed, intra-cerebral inoculation of brain homogenates from aged transgenic mice overexpressing mutant α -Syn to cognate young transgenic animals susceptible to spontaneous α -Syn aggregation or to wild-type (WT) mice leads to early motor deficits and α -Syn deposition in the rodent central nervous system (Betemps et al., 2014; Luk et al., 2012b; Masuda-Suzukake et al., 2013). Yet whether PD-associated disease hallmarks spread through a prion-like process in human brain remains to be substantiated. The extent to which fibrillar α -Syn assemblies bind to human mature neurons, are taken up, seed the aggregation of their soluble counterparts, trigger neuronal dysfunctions, and propagate from one neuron to another remains to be determined. Human pluripotent stem cell (hPSC) technologies have become a key asset for deciphering pathological mechanisms (Grskovic et al., 2011). Several proofs of concept have shown that hPSC differentiation into neurons is paramount to study neurodegenerative syndromes as it provides direct access to cultures enriched in human post-mitotic neurons with region/subtype-specific identities (Gaspard et al., 2009). Previously, we (1) demonstrated the reconstruction of fully functional and oriented rodent neuronal networks in microfluidic chips (Deleglise et al., 2014; Dinh et al., 2013;

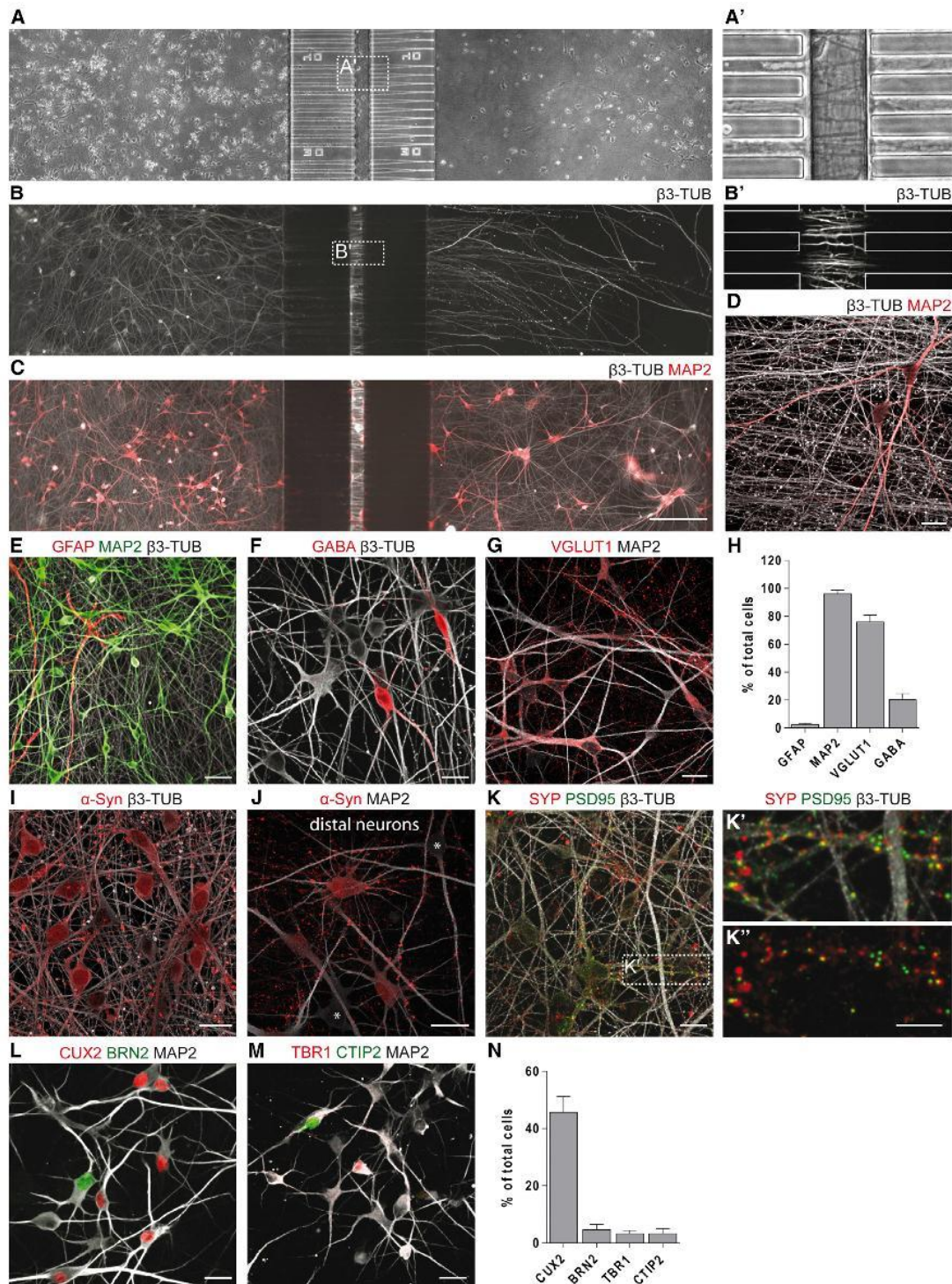


Figure 1. Characterization of hiPSC-Derived Corticocortical Neuronal Networks

(A) Phase-contrast stitched image of hiPSC-derived neuronal networks 30 days post-plating. (A') Inset of central chamber invaded by axons.

(legend continued on next page)



Peyrin et al., 2011), (2) gained unlimited access to standardized human telencephalic neurons from hPSCs (Nicoletau et al., 2013), and (3) demonstrated uptake and active anterograde and retrograde transport of fibrillar α -Syn in mouse neurons (Brahic et al., 2016; Freundt et al., 2012). Here, taking advantage of these studies we reconstructed human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neuronal networks in microfluidic cell culture chambers and demonstrated that two structurally and functionally distinct α -Syn strains we named ribbons and fibrils (Bousset et al., 2013; Peelaerts et al., 2015) can efficiently propagate through such human WT neuronal networks. Both strains are able to reach the cytoplasmic compartment after direct internalization or upon neuron-to-neuron-mediated transfer (Abounit et al., 2016; Flavin et al., 2017) and elicit endogenous α -Syn aggregation in human cortical neurons. This process is progressive, and dose and structure dependent, with ribbons bearing a more potent seeding activity over a few weeks. Accumulation of α -Syn somatic inclusions correlates with neuronal activity impairment and mitochondrial dysfunctions. This model combining human connected WT neurons and a trigger input is representative of the sporadic form of synucleinopathies and indicates that α -Syn prion-like spreading occurs in human neuronal networks where α -Syn expression is physiological and may account for the progression of age-related neurodegeneration in humans. This model represents a significant improvement over previous models where WT or mutant α -Syn is over-expressed in rodents (Luk et al., 2012b; Peelaerts et al., 2015).

RESULTS

Reconstruction of Oriented Human Corticocortical Network

To assess α -Syn assembly propagative properties in a human neuronal network we sought to combine neurons

generated from hiPSCs derived from a healthy donor with microfluidic technologies allowing the reconstruction of an oriented neuronal network. We generated dorsal telencephalic neuronal progenitors from hPSCs (iPSC lines i90cl17 and i90cl16) as previously described (Nicoletau et al., 2013) and differentiated them into post-mitotic neurons (Feyeux et al., 2012). Our microfluidic devices are composed of three independent cell culture chambers separated by asymmetric microchannels that allow unidirectional axonal growth from the emitting to the receiving chamber (Figures 1A and 1A') (Deleglise et al., 2013; Peyrin et al., 2011). hiPSC-derived neurons extended neurites through the microchannel that surrounded neurons in the distal chambers within 4 weeks of plating (Figures 1A'–1D). Phenotype and cortical regional identity of human neurons were assessed by immunofluorescence after 30 days of differentiation in chips. These hiPSC-derived cultures were highly enriched in neurons (>90%, MAP2⁺), with a small percentage differentiating into astrocytes (<3%, GFAP⁺) (Figures 1E and 1H). The neurons were composed of about 20% inhibitory GABA⁺ neurons (Figures 1F and 1H) and about 75% glutamatergic VGLUT1⁺ neurons (Figures 1G and 1H). We detected α -Syn expression in nuclei and perikarya of the majority of neurons (Figures 1I and 1J), with enrichment in synaptic boutons particularly visible in the distal chamber, where axons from proximal neurons converged on the resident cells (Figure 1J). Juxtaposition of pre-synaptic (synaptophysin, SYP) and post-synaptic density protein-95 (PSD95) staining along dendrites was detected as well, indicating the establishment of excitatory synapses (Figures 1K–1K''). Those neurons expressed a variety of cortical markers, including upper- (BRN2, CUX2; Figures 1L and 1N) and, to a lesser extent, deep-layer cortical markers (TBR1, CTIP2; Figures 1M and 1N). Altogether, our results indicate that mature oriented human corticocortical networks reminiscent of neuroanatomical pathways within human brain can be reliably obtained in the microfluidic devices we used.

(B–D) (B and C) Fluorescence images (white, β 3-tubulin [β 3-TUB]; red, MAP2) of hiPSC-derived neurons in the proximal chamber projecting their axons into the distal chamber (B) in the absence or (C) in the presence of target neurons. (B' and D) Higher-magnification images showing (B') axons crossing the central chamber of the microchannel compartment and (D) axon bundles exiting the microchannel in the distal chamber.

(E–H) Representative images and quantification of astrocytic (GFAP) and neuronal (MAP2, β 3-TUB, GABA, VGLUT1) marker expression. (E) GFAP, MAP2, β 3-TUB; (F) GABA, β 3-TUB; (G) VGLUT1, MAP2; (H) percentage of cells expressing each marker.

(I and J) (I) Expression of α -Syn in nuclei and perikarya of neurons (asterisks point out negative cells) and enrichment in synaptic boutons (J, distal chamber).

(K–K'') (K) Identification of putative excitatory synapses by juxtaposition of pre- (red, SYP) and post- (green, PSD95) protein complexes along neurites (white, β 3-TUB). (K') Magnification of box indicated in (K).

(L–N) Representative images and quantification of a repertoire of distinct cortical neuronal markers. (L) CUX2, BRN2, MAP2; (M) TBR1, CTIP2, MAP2; (N) percentage of cells expressing each marker.

Data are shown as mean \pm SEM; n = 3. Scale bars: 200 μ m in (A–C), 20 μ m in (A', B', and D), 40 μ m in (E), 20 μ m in (F, G, and I–M), 10 μ m in (K' and K'').

Axonal Transport and Inter-neuronal Spreading of α -Syn Assemblies in Reconstructed Human Corticocortical Networks

We used our setup to investigate in a human context the properties of two distinct α -Syn strains, coined as fibrils and ribbons (Bousset et al., 2013), that have been previously shown to trigger distinct synucleinopathies in rodents (Peelaerts et al., 2015). To assess their prion-like behavior in hiPSC-derived cortical neurons, we specifically measured the uptake, intra-cellular transport, inter-neuronal transfer, and seeding propensity of each strain.

To determine whether α -Syn assemblies could be taken up and transported along the axons, neurons within the proximal chamber of 30 day old reconstructed human corticocortical networks were exposed to Atto-550-labeled α -Syn monomers, fibrils, or ribbons. The fluorescent signal was longitudinally analyzed by live imaging microscopy in both proximal and distal microfluidic chambers 1, 7, 15, and 21 days post-exposure (dpe). Starting from 1 dpe about 90% of the neurons in the proximal chamber exposed to both ribbons and fibrils clearly presented Atto-550 dots in their cytoplasm that persisted over time. In contrast, cells exposed to monomeric α -Syn exhibited a diffuse Atto-550 signal with very few puncta that were almost completely lost over time (Figure 2A, left), suggesting that monomeric and fibrillar α -Syn have different clearance dynamics. To gain molecular insight into fibrillar α -Syn uptake, we exposed neurons to monodansone, an inhibitor of receptor-mediated endocytosis, or to dynasore, an inhibitor of dynamin, prior to addition of the exogenous α -Syn fibrillar strains. Uptake of Atto-550 α -Syn strains (fibrils and ribbons) was strongly reduced by monodansone (70 μ M), while dynasore (80 μ M) only partially reduced uptake (Figure S2A). Ordered movements of small fluorescent exogenous α -Syn puncta were evidenced in the axonal extension crossing the microchannel barrier. We distinguished between anterograde and retrograde axonal transport of fluorescent α -Syn strains, performing time-lapse imaging at the exit of microchannels in the distal chamber. Both strains were transported anterogradely and retrogradely in human neurons (Figures 2B and 2C and Videos S1 and S2). The mean anterograde velocities were 2.6 ± 1.4 and 2.7 ± 0.9 μ m/s for fibrils and ribbons, respectively, consistent with the fast component of axonal anterograde transport. Assemblies transported retrogradely moved at 1.3 ± 0.8 μ m/s for the fibrils and 1.2 ± 0.7 μ m/s for ribbons (Figure 2C), thus creating a net axonal anterograde flux upon somatodendritic loading. During the time of recording, the two α -Syn strains displayed similar average run lengths (98–128 μ m) (Figure 2D).

We next quantified the spread of α -Syn strains from neurons in the proximal chamber to connected neurons in the distal chamber (Figure 2A, right). Again, the proportion of

neurons with detectable signal from Atto-550-labeled monomeric α -Syn was very low and almost disappeared over time, whereas that of neurons presenting Atto-550 dots in their soma after exposing afferent neurons in the proximal chamber to fibrils or ribbons significantly increased up to 15 dpe, and then plateaued (Figure 2A, right). Similar inter-neuronal transfer capacities were observed for the two α -Syn strains. Monodansone and dynasore affected inter-neuronal transfer (from the proximal to the distal chambers of the microfluidic device) of Atto-550 α -Syn strains (Figures S2B and S2C). Thus, endocytosis appears to contribute significantly to α -Syn assembly spreading between human cortical neurons. Overall, these data demonstrate that α -Syn strain spread between human neurons is a fast and efficient process involving internalization followed by anterograde axonal transport to the axonal ends and spread to secondary neurons. Interestingly, the efficiency of uptake, transport, and inter-neuronal transfer over time was similar for fibril and ribbon strains (Figure 2A).

Seeding of Endogenous α -Syn in Human Cortical Wild-Type Neurons

Seeding and accumulation of phosphorylated host-encoded cognate α -Syn following trans-neuronal propagation is key for the concept of prion-like spreading along nerve pathways in PD. We therefore assessed whether exogenous human α -Syn strains provide a template for the assembly of endogenous WT human α -Syn into aggregates characteristic of pathological α -Syn. Mature (30 day old) hiPSC-derived cortical neurons were exposed to monomeric α -Syn, ribbons, or fibrils for 24 h and incubated for 30 days. Additional control conditions included human cortical neurons exposed to Atto-550-labeled fibrillar human huntingtin exon 1 with 48 glutamine residues (HTTExon1Q48). We used both immunofluorescence and biochemical analysis to assess the formation of abnormal α -Syn, monitoring in particular its detergent insolubility and its phosphorylation at position serine 129 (S129).

Thirty days after exposure of hiPSC-derived cortical neurons to α -Syn fibrils and ribbons, phosphorylated α -Syn (α -SynP) clumps were detected (Figures 3A and 3B). No α -SynP signal was detected upon neuronal exposure to either monomeric α -Syn or HTTExon1Q48 fibrillar assemblies (Figures 3C and 3D). These results were confirmed using a second α -SynP antibody (α -SynP EP1536Y), which was previously demonstrated not to cross-react with phosphorylated neurofilament (Rutherford et al., 2016; Sacino et al., 2014b) (Figure 3E).

We then challenged human cortical neurons with a version of α -Syn strain that retains its deleterious activity while being non-phosphorylatable at amino acid residue S129 because this residue was changed into an alanine

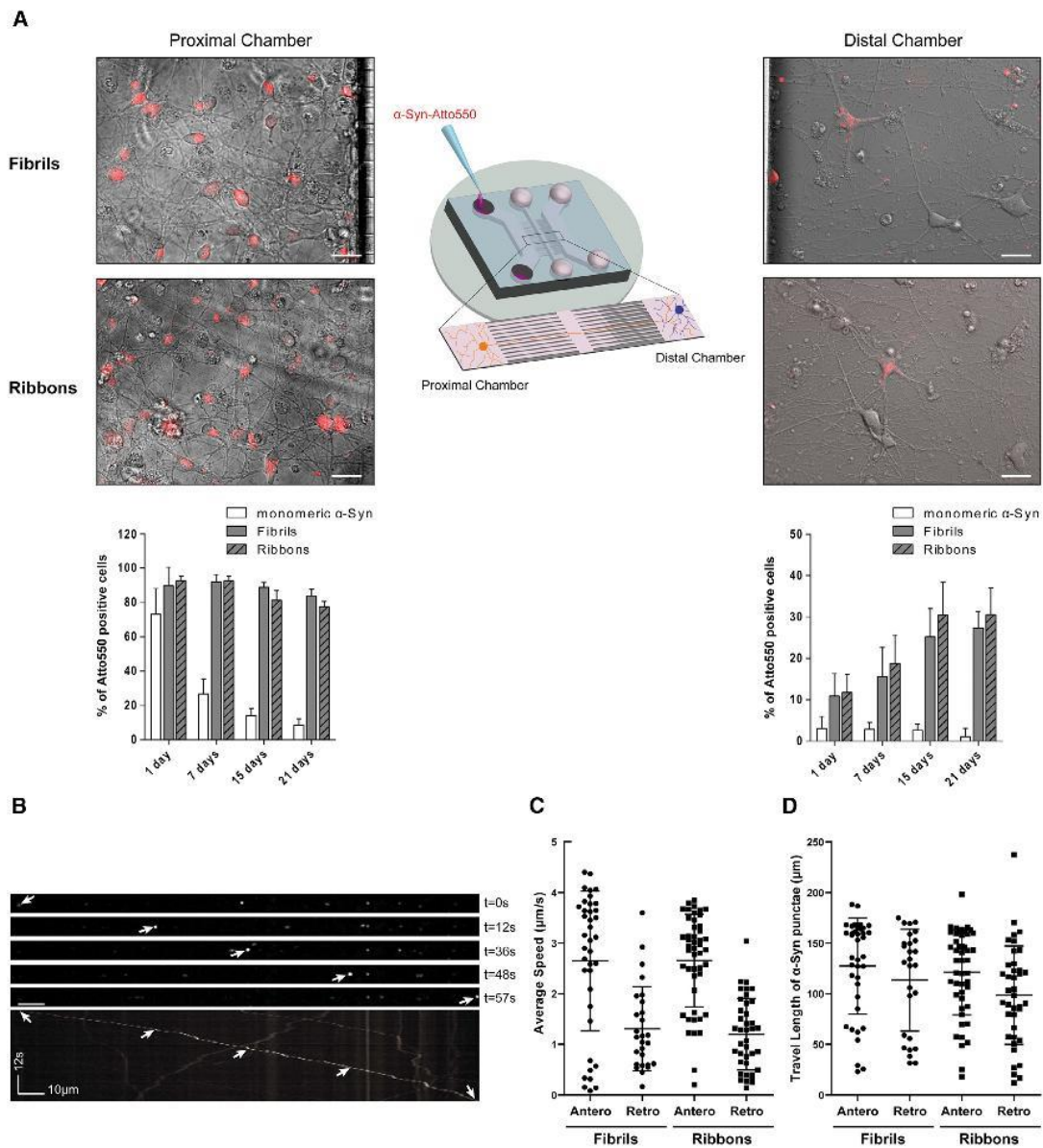


Figure 2. Intra-neuronal and Inter-neuronal Spreading of α -Syn Assemblies

(A) Fluorescence and phase-contrast images of 30 day old corticocortical neuronal networks exposed for 24 h in the proximal chamber (left) to 500 nM Atto-550-labeled fibrils (top) or ribbons (bottom). The bar graphs show quantitative assessment of Atto-550-labeled α -Syn monomers, fibrils, and ribbons taken up by loaded neurons (left) and transferred to receiving neurons (right) at 1, 7, 15, and 21 dpe. Significant differences were observed between strains and between days post-exposure in both proximal and distal chambers (for statistical analysis see [Supplemental Information](#)). Data are shown as \pm SD.

(B) Kymograph analysis of α -Syn fibril movement along axons extending from the proximal chamber in a typical recording performed at 24 h post-loading.

(C and D) Analysis of α -Syn assemblies' anterograde and retrograde movement in axonal tracts. (C) Average speed. (D) Travel length. Data are shown as mean \pm SD. Scale bars: 25 μ m.

([Febbraro et al., 2013](#); [Gorbatyuk et al., 2008](#)). After exposure to fibrillar S129A α -Syn exogenous assemblies, human mature neurons exhibited aberrant phosphorylation and

clustering of the endogenous α -Syn ([Figure 3E](#), and data not shown for α -SynP EP1536Y antibody). Altogether, these results show that exogenous α -Syn ribbons and fibrils

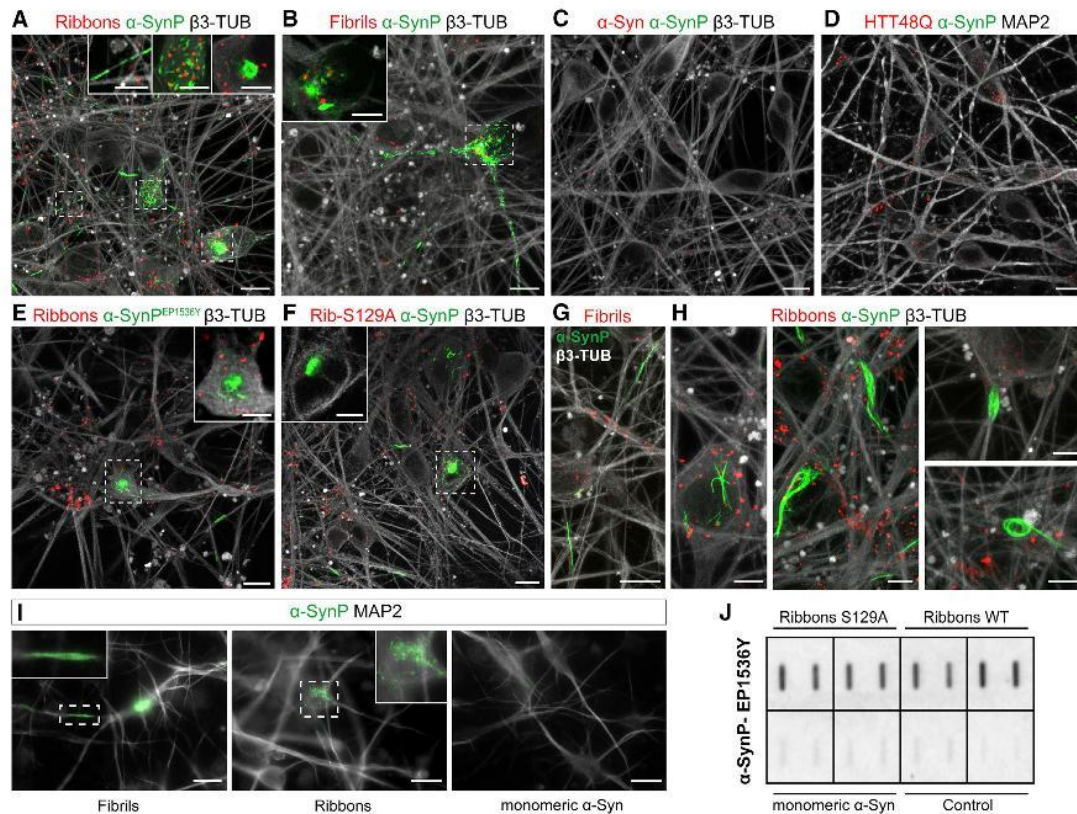


Figure 3. Immunofluorescence Analysis of Seeded Endogenous α -Syn Aggregation in hiPSC-Derived Cortical Neurons

(A–F) Fluorescence confocal imaging of endogenous α -SynP (green) in human cortical neurons (β 3-TUB or MAP2, gray) at 30 dpe to 500 nM Atto-550 (red) (A and E) α -Syn ribbons, (B) α -Syn fibrils, (C) monomeric α -Syn, (D) HTTExon1Q48, and (F) S129A ribbons using two different α -SynP antibodies (α -SynP, ab59264 in A–D and F–H, and α -Syn^{EP1536Y}, ab51253 in E). The regions boxed with dashed lines are enlarged and represented as single plane in the insets. Scale bars: 10 μ m, 5 μ m in insets.

(G and H) Representative images showing that α -SynP inclusions triggered by either (G) fibrils or (H) ribbons exhibit different classes of shapes (green, α -SynP; white, β 3-TUB; red, exogenous assemblies); scale bar: 10 μ m in (G), 5 μ m in (H).

(I) Resistance of endogenous α -SynP signal to paraformaldehyde/Triton X-100 fixation/extraction immunofluorescence protocol (green, α -SynP; white, MAP2); scale bar: 20 μ m.

(J) Filter trap assay for α -SynP (α -Syn^{EP1536Y} antibody) in cortical neuron lysates at 30 dpe to ribbons made of wild-type or S129A α -Syn or monomeric α -Syn or in the absence of treatment. Each square represents duplicates of the sample.

trigger the specific formation of inclusions made of endogenous α -SynP in hiPSC-derived cortical neurons. Astroglial cells in our cultures readily took up the exogenous assemblies that strongly associate with lysosomal marker (Figure S3A) but, in contrast to neurons, none of those cells ever contained α -SynP structures (Figure S3B), thus evidencing that human astrocytes do not contribute actively to the amplification of α -Syn strains. Both strains promoted the formation of α -SynP inclusions in neurons bearing different aspects, including compact agglomerated, annular, and filiform/serpentine structures in both the somatodendritic compartment and the axonal endings (Figures 3A, 3B, and 3E–3H). Interestingly, α -SynP inclusions present in the somatic compartment were always

found juxtaposed to exogenous Atto-550-labeled α -Syn or α -Syn S129A ribbons or fibrils (single-plane insets in Figures 3A, 3B, 3E, and 3F), suggesting a physical interaction between the exogenous input and the α -SynP somatic inclusions. The α -SynP inclusions formed upon fibril and ribbon exposure are resistant to a paraformaldehyde/Triton X-100 fixation/extraction and immunofluorescence protocol (Figure 3I), indicating that α -SynP morphotypes have an insoluble nature (Volpicelli-Daley et al., 2016).

These results were confirmed using a filter trap assay (Figure 3J), in which comparable amounts of α -SynP signal were reproducibly detected in samples originating from neurons exposed to WT or mutant S129A α -Syn ribbons. This further proves that the α -SynP we detect corresponds

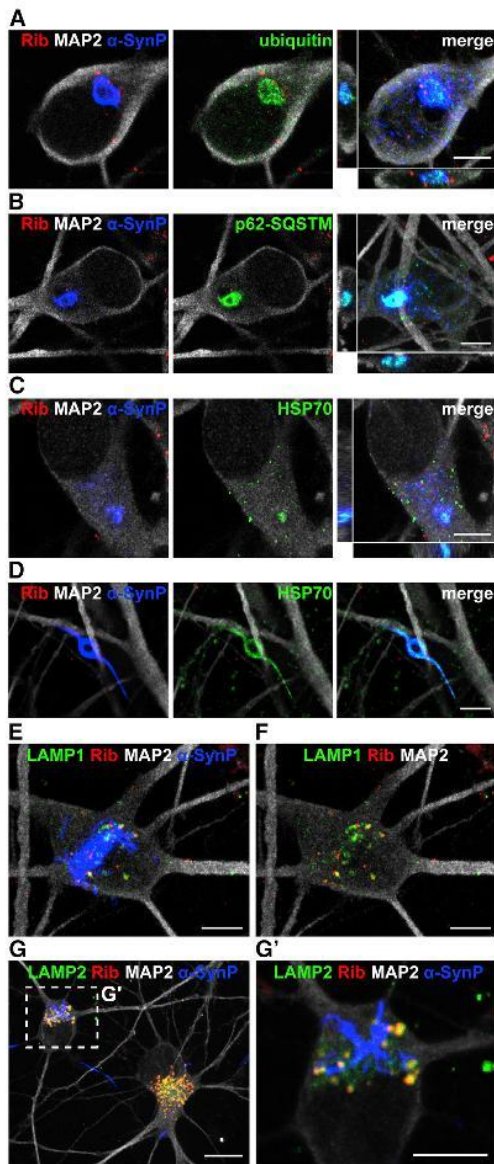


Figure 4. Characterization of α -SynP Somatodendritic Inclusions (A–D) (A) Anti-ubiquitin, (B) anti-p62-sequestosome1, and (C and D) anti-HSP-70 immunostaining (green) and colocalization with endogenous α -SynP aggregates (blue) in neurons (MAP2, white) treated with ribbons (abbreviated here Rib, red) at 21 dpe. HSP-70 labeled the dense core of (C) somatic or (D) neuritic α -SynP inclusions. For each line the first two images represent single plane, whereas merge panels are composed of z stack projection. (E–G) (E and F) LAMP1 and (G and G') LAMP2 immunostaining (green) largely colocalized with exogenous assemblies (ribbons, red) but did not show appreciable association with α -SynP structures (blue). Scale bars: 5 μ m in (A–F and G'); 10 μ m in (G).

to seeded endogenous cortical neurons' α -Syn, not the exogenous seeds, as they are not recognized by the α -SynP S129 antibodies. We did not observe α -SynP in neurons exposed to monomeric α -Syn.

We next labeled oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors with the O4 antibodies in our human cortical cultures exposed to α -Syn assemblies (21 dpe). We observed that exogenous α -Syn assemblies are readily taken up by the few O4⁺ cells present in our cultures (Figure S4). In line with our *in vivo* observation in Peelaerts et al. (2015), no α -SynP inclusions could be detected in those O4⁺ cells (Luk et al., 2012b; Peelaerts et al., 2015).

Characterization of α -SynP Inclusions in Human Wild-Type Neurons

The cores of the large somatodendritic α -SynP inclusions were positive for ubiquitin (Figure 4A) and strongly colocalized with SQSTM1-p62 (Figure 4B), an adaptor protein that delivers ubiquitinated cargoes to autophagy. In addition, the dense core of somatic inclusion as well as the neuritic filamentous inclusions was partially labeled by HSP-70 (Figures 4C and 4D), further indicating that endogenous aggregated α -Syn is targeted to degradation. We next assessed the association of exogenous assemblies and endogenous α -SynP inclusions with the lysosomal compartment in neurons. Exogenous α -Syn fibrils and ribbons largely colocalized (80% colocalization) with the lysosomal markers LAMP1 and LAMP2 at 21 dpe, indicating that the assemblies persist within the lysosomal compartment over several weeks. In contrast, α -SynP aggregates, including large filamentous, annular, or fragmented structures, were not found associated with LAMP1 and LAMP2 staining, which suggests that they are not within lysosomes/autophagosomes but within the cytosol. These structures resist degradation and accumulate in the cytoplasm of neurons. Altogether the variety of intra-neuronal inclusions we observed following exposure of human neurons to α -Syn fibrils and ribbons strikingly resembles, based on morphology, distribution, and colocalization with components of the protein degradation machinery, Lewy bodies and Lewy neurites found in the brain of PD patients (Goedert et al., 2013).

Differential Seeding Properties of Ribbons and Fibrils: Dose- and Time-Dependence Analyses in Human Cortical Neurons

Using the ratio between the area occupied by α -SynP and MAP2 in neurons exposed to α -Syn strains as a readout of strain nucleation capacities, we performed dose-dependence analyses treating cells with up to 4.5 μ M ribbons or fibrils. The data we obtained with ribbons at 15 dpe fitted a sigmoidal curve (Figures 5A and 5B) and allowed us to estimate a half-maximal effective concentration

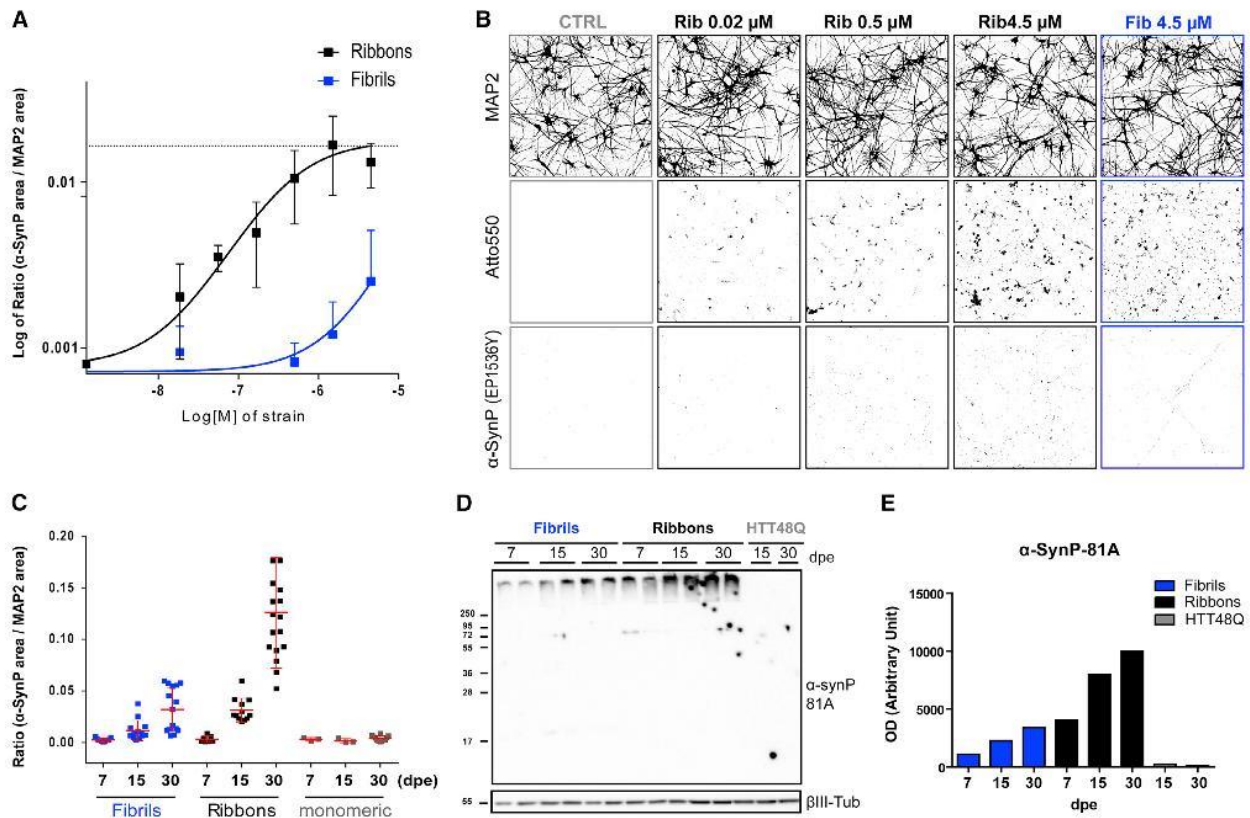


Figure 5. Dose- and Time-Dependent Effect of α -Syn Strain Exposure

(A) Ratio (logarithmic scale) between the area occupied by α -SynP and MAP2 at increasing concentration of fibrils and ribbons ($0.02 < x < 4.5 \mu\text{M}$, 15 dpe; mean \pm SD; $n = 2$).
 (B) Binary threshold masks of MAP2, Atto-550 assemblies, and α -SynP structures of control neurons (untreated, gray boxed) or neurons exposed at different concentrations of ribbons (black boxed) or fibrils (blue boxed).
 (C) Ratio between the area occupied by α -SynP and MAP2 over time (7, 15, and 30 dpe; [strains] = 500 nM). Data are shown as mean \pm SD, $n = 3$ (for statistical analysis see [Supplemental Information](#)).
 (D and E) (D) Western blot analysis and (E) quantification showing the progressive accumulation of α -SynP in the insoluble fractions of neuron lysates at 7, 15, and 30 dpe to fibrils, ribbons, or fibrillar HTTExon1Q48 (α -SynP-81A antibody).

(EC_{50}) (355 nM). For fibrils, the data fitted only partially a sigmoid curve and indicated an EC_{50} likely 2 log larger than that of ribbons. Interestingly, no significant changes in cortical neuron viability (pyknotic/normal DAPI-positive nuclei) or overall morphology (MAP2 total area per cell) were observed at any concentration of ribbons or fibrils we used (Figure 5B).

Next, we assessed the progressive accumulation of α -SynP in human cortical neurons exposed for 24 h to exogenous α -Syn fibrils and ribbons ($0.5 \mu\text{M}$) from 7 to 30 dpe (Figure 5C). The α -SynP/MAP2 ratio significantly increased with time, while it remained constant in neurons exposed to monomeric α -Syn. A higher α -SynP signal was measured upon exposure of neurons to ribbons compared with identical amounts of fibrils, in particular at the longest time point we analyzed (30 dpe, $p < 0.001$). These results

were confirmed by biochemical analysis, where the amount of sarkosyl-insoluble α -SynP increased from 7 to 30 dpe for both strains (Figure 5D) and was 3-fold higher in cells exposed to ribbons compared with fibrils (Figure 5E). Altogether these experiments show that the exposure of WT human cortical neurons to α -Syn strains triggers the progressive conversion of homotypic neuronal α -Syn into insoluble and α -SynP aggregates and that this phenomenon depends on the strain conformation, with ribbons being more efficient than fibrils.

Neuronal Dysfunctions Associated with Exposure to α -Syn Strains and α -SynP Accumulation

We next investigated whether human neurons treated with α -Syn assemblies featured any type of early signs of neuronal dysfunction weeks after exposure to the strains

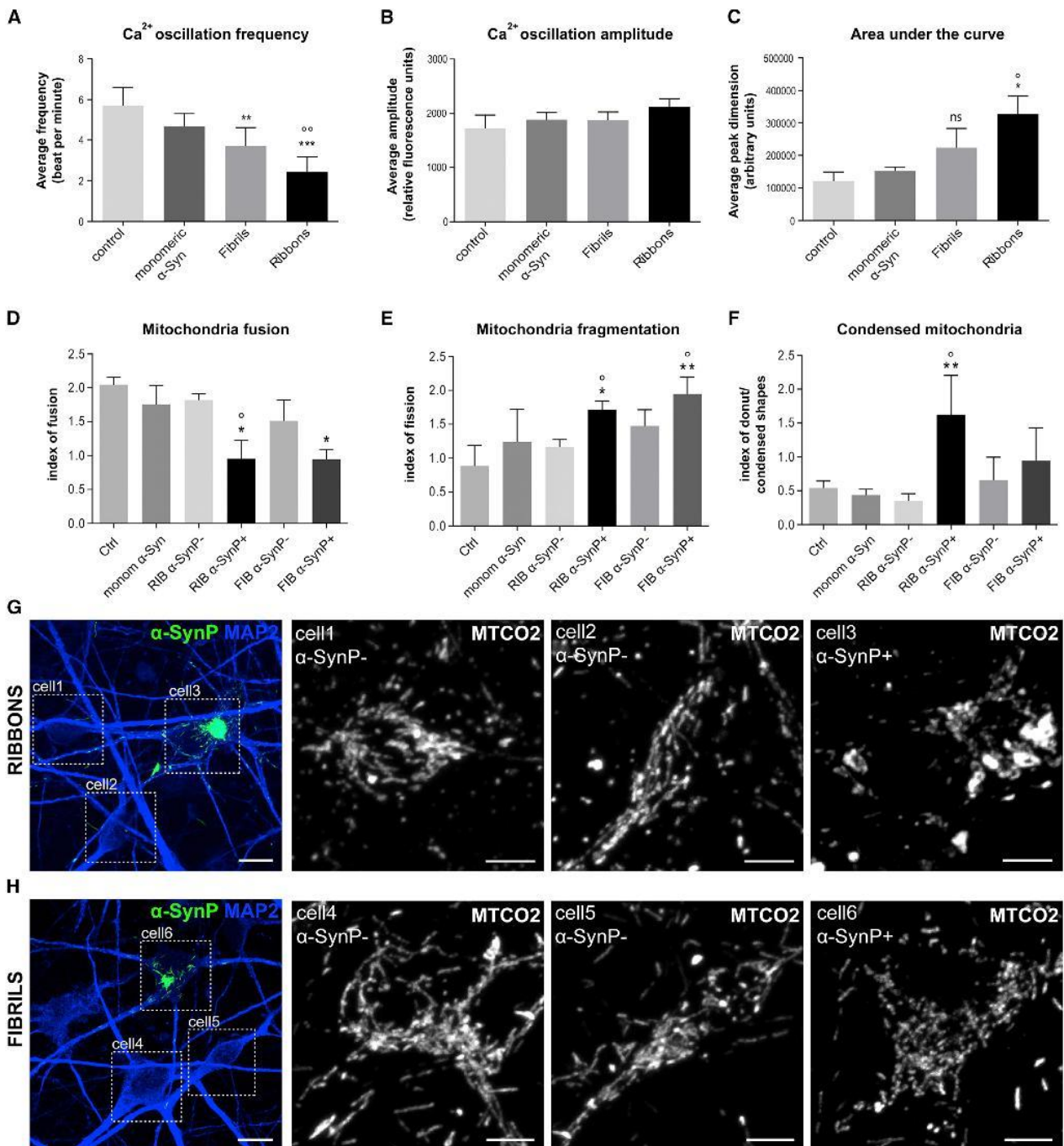


Figure 6. Alteration in Ca²⁺ Homeostasis and Morphological Impairment of Mitochondrial Networks in Human Neurons Following Exposure to α -Syn Strains and α -SynP Accumulation

(A–F) (A–C) Whole-well Ca²⁺ imaging analyses on mature human cortical neurons 19 dpe to fibrils, ribbons, monomeric α -Syn, and untreated neurons. The (A) average frequency, (B) average amplitude, and (C) average area under the curve of the Ca²⁺ waves were analyzed for each well. Asterisks indicate significant difference of α -Syn strain-treated neurons versus control; circles indicate significant difference of α -Syn strain-treated neurons versus monomeric α -Syn. (D–F) Analysis of the index of (D) fusion, (E) fragmentation, and (F) donut-shaped/condensed mitochondria in untreated neurons or neurons at 21 dpe to monomeric α -Syn, ribbons, or fibrils. Asterisks indicate

(legend continued on next page)

despite the absence of evident morphological demise. We first performed Ca^{2+} imaging analysis on mature human cortical neurons exposed to ribbons, fibrils, and monomeric α -Syn. Synchronized spontaneous Ca^{2+} oscillations were recorded at 1 and 19 dpe using whole-well Fluo-4 calcium imaging (Figures 6A–6C and S5). All the parameters of these oscillations were comparable for untreated and monomeric α -Syn-treated neuronal cultures at 1 and 19 dpe. We detected minor alterations of average frequency and dimension (area under the curve, AUC) of Ca^{2+} waves at 1 dpe in α -Syn strain-treated neuronal cultures (Figures S5B and S5C). The extent of these alterations increases with time. At 19 dpe the frequency (Figures 6A and S5A) and the AUC (Figures 6C and S5A) were significantly altered for cultures exposed to ribbons (compared with untreated or monomeric α -Syn-treated cultures at 19 dpe), while the amplitude remained unchanged (Figure 6B); 19 dpe to fibrils triggered only a significant decrease in frequency (Figures 6A and S5A). The α -SynP/MAP2 ratio measured by immunofluorescence on cultures at 19 dpe and after Ca^{2+} analysis (same well analysis) showed nucleation levels similar to those presented in Figure 5C. Our observations indicate that neuronal cultures exposed to α -Syn strains present alterations in Ca^{2+} homeostasis that worsen over time in parallel with the progression in α -SynP accumulation (Figure S5B).

Several lines of evidence link mitochondrial dysfunction and α -Syn aggregation (Di Maio et al., 2016; Grassi et al., 2018; Prots et al., 2018; Reeve et al., 2015). We thus compared the morphology of mitochondria networks in control neurons and neurons exposed to ribbons, fibrils, and monomeric α -Syn (21 dpe). Neurons bearing somatic α -SynP inclusions induced by exposure to either ribbons or fibrils presented altered mitochondria morphologies. In particular, we observed significant reduction of tubular fused networks (Figures 6D, 6G, and 6H), increase in the proportion of fragmented mitochondria (Figures 6E, 6G, and 6H), and increase in the donut-shaped/condensed mitochondria (Figures 6F–6H). Control cells (unexposed or exposed to monomeric α -Syn) or cells lacking α -SynP inclusions from cultures exposed to exogenous α -Syn strains did not exhibit such alterations (Figures 6D–6F). These results demonstrate co-occurrence in human neurons of seeding events of endogenous α -Syn triggered by ribbons or fibrils and mitochondrial impairment.

Phosphorylated α -Syn Propagation through Fluidically Isolated Human Cortical Neuronal Networks

Last we investigated whether exogenous α -Syn assemblies loaded only in the proximal chamber triggered, after spreading between neurons, the seeding of endogenous α -Syn in second-order neurons (i.e., located in the distal chamber). For this, neurons grown in the proximal chamber of corticocortical networks were challenged with α -Syn assemblies, either WT or S129A α -Syn ribbons, and the time course of α -SynP inclusions was monitored in the distal chamber. Starting from 15 dpe, α -SynP structures, mainly filiform shaped, were clearly detected in axons expanding from neurons residing in the emitting chamber (Figure 7A) but not in the unchallenged resident neurons. Three weeks after the exposure of proximal cells to ribbons made of either WT or S129A- α -Syn, α -SynP-positive clusters could be detected in the cytoplasm of a few second-order neurons in the distal chamber. The α -SynP structures ranged from small dots to more complex filiform architectures (Figures 7B and 7C), mainly detectable in the somatic compartment of second-order neurons of the distal chamber. Almost all the cells presenting α -SynP signal in the distal chamber also contained detectable exogenous aggregates, with very rare exception, thus suggesting that trans-neuronal nucleation was mainly due to initial seeds taken up by neurons in the proximal chamber that were subsequently transferred to second-order acceptor neurons.

DISCUSSION

Prion-like propagation of α -Syn aggregates (Brundin and Melki, 2017; Melki, 2015) is a scenario that could identify the sources of exogenous, non-genetic initiation of PD in patients and account for the sequential appearance of pathological hallmarks in different brain areas (Braak et al., 2003a; Jellinger, 2012). Here, we provide results that validate the prion-like propagation hypothesis of α -Syn aggregates at the human level. This is done in human neuronal cultures, made of cortical neurons and glial cells (>90% and <3% of cells, respectively), expressing genome-encoded WT α -Syn, as opposed to models where transgenic WT or mutant α -Syn is overexpressed (Luk et al., 2012b; Peelaerts et al., 2015).

significant differences of treated neurons versus control; circles indicate significant differences of α -SynP⁺ versus α -SynP⁻ cells in the same culture. * and ^op < 0.05, ** and ^{oo}p < 0.01, ***p < 0.001. Data are shown as mean \pm SEM, n = 3 (for statistical analysis see Supplemental Information).

(G and H) Representative confocal images of neurons exposed to (G) ribbons and (H) fibrils. On the left the cells are stained for MAP2 (blue) and α -SynP (green). Highlighted cells (dotted lines) are enlarged and stained with MTCO2 (white). Cells 1, 2, 4, and 5 are α -SynP⁻. Cell 3 and cell 6 are α -SynP⁺. Scale bars: 10 μ m in left image of (G) and (H); 5 μ m in cell insets.

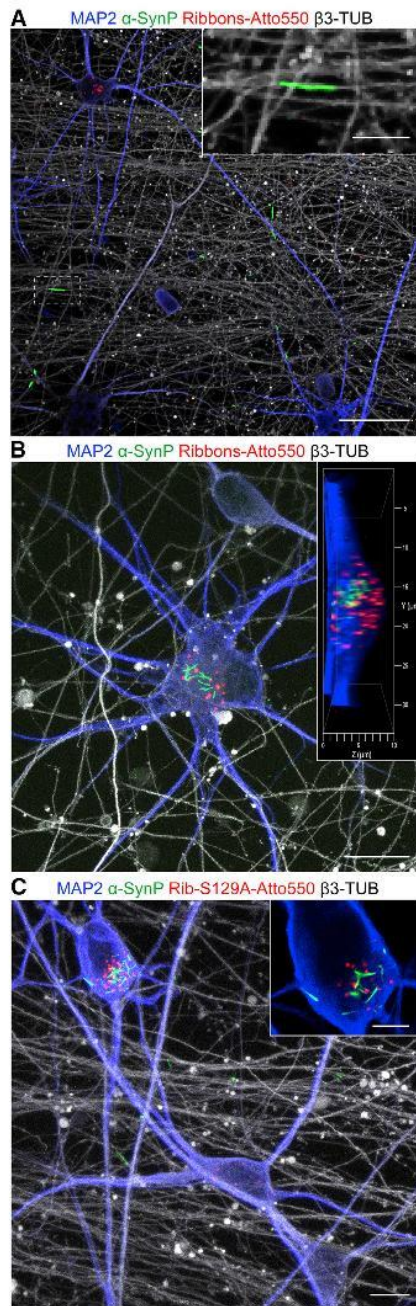


Figure 7. Induction of Trans-neuronal Nucleation

Fluorescence confocal imaging illustrating endogenous α -SynP (green) in the distal chamber upon seeding of proximal neurons with exogenous α -Syn ribbons (made of WT in A and B, S129A α -Syn in C, red). Axons deriving from proximal neurons are identified using β 3-tubulin (β 3-TUB, gray), while neurons residing in the distal chamber are identified by MAP2 staining (blue).

(A) α -SynP filiform structures are present in proximal neurons axons at 15 dpe.

We demonstrate that two different strains of human α -Syn (fibrils and ribbons) are transported, traffic between human neurons, and trigger the progressive accumulation of PD-like pathological hallmarks by recruiting the endogenous soluble α -Syn. We show that these assemblies act in a dose- and structure-dependent manner. The PD hallmarks they trigger in WT human cortical neurons, which include Lewy body- and Lewy neurite-like structures consisting of insoluble deposits of α -SynP, SQSTM1-p62, and HSP-70, correlate with early signs of neuronal dysfunctions such as alterations in calcium homeostasis and mitochondrial morphology.

We aimed at modeling α -Syn prion-like propagation in human corticocortical neuronal networks because it is affected at different stages of sporadic PD, DLB, and MSA (Braak et al., 2003a; Salvesen et al., 2017; Sugiura et al., 1995; Yau et al., 2018) and the conversion of endogenous WT α -Syn into pathological α -SynP aggregates may contribute to neuronal dysfunction in excitatory glutamatergic cortical neurons. Moreover, we chose to use hiPSCs from normal subjects specifically to model pathological processes involving α -Syn protein in idiopathic PD patients, by far the most numerous PD patients.

Our observation that α -SynP aggregates accumulate progressively over 30 days in neuronal axons and somatodendritic compartments suggests that α -Syn strains trigger sustained nucleation of host-encoded neuronal α -Syn. The fact that fluorescently labeled exogenous α -Syn strains do not overlap with α -SynP foci also shows that exogenous α -Syn assemblies not only are not phosphorylated, in agreement with previous findings (Pieri et al., 2016), but trigger endogenous α -Syn aggregation, with subsequent massive phosphorylation of the latter. To further strengthen this set of converging evidence, we used not only different anti- α -SynP antibodies (Rutherford et al., 2016; Sacino et al., 2016; Uchiyama and Giasson, 2016) but also strains made of variant α -SynP (α -Syn S129A) that cannot be phosphorylated on residue S129, and thus are undetectable with anti-phospho-S129 α -Syn antibodies. Our data unambiguously show that (1) exogenous α -Syn strains trigger the progressive accumulation of PD-related hallmarks in human WT neurons by progressive corruption of the endogenous α -Syn and (2) this phenomenon is not prevented by mutations that compromise

(B and C) At 21 dpe, α -SynP-positive clusters are detected as well in the cytoplasm of sparse distal neurons. Insets in (A) and (C) are enlargements of specific regions (highlighted with dotted lines if needed). Inset in (B) represents 3D reconstruction and orthogonal view of the intra-cellular α -SynP structures (Airyscan super resolution). Inset in (C) represents a single plane of the α -SynP cell. Scale bars: 40 μ m in (A), 10 μ m in (B) and inset in (A), 20 μ m in (C), 5 μ m in inset in (C).

phosphorylation of exogenous seeds on this specific site (Azeredo da Silveira et al., 2009; Tenreiro et al., 2014). Furthermore, we showed that large cytosolic α -SynP somatic inclusions bear marks of cellular recognition as aggregated proteins and are targeted to autophagy as demonstrated by colocalization with ubiquitin, SQSTM1-p62, and HSP-70. Interestingly, this was observed only in neurons under our experimental conditions. Indeed, while rare astrocytes present in the cell culture chambers displayed internalized fluorescent α -Syn assemblies, we were never able to detect α -SynP inclusion in these cells. This is due to either lower seeding efficiency of exogenous α -Syn strains or higher clearance efficiency of aggregated α -Syn in astrocytes (Loria et al., 2017). Exogenous assemblies were rapidly internalized by most of the directly exposed neurons within the proximal chamber and transported along their axons to cells residing in the distal chamber. We confirmed that the direct uptake of extracellular aggregates from the medium as well as the inter-neuronal transfer from acceptor to donor neurons mainly relies on endocytic processes (Apetri et al., 2016; Flavin et al., 2017; Lee et al., 2008; Sacino et al., 2016) (Brahic et al., 2016; Freundt et al., 2012).

Both α -Syn strain assemblies were transported with similar axonal velocities. They also propagated between neurons at similar rates. This is interesting and may suggest that α -Syn strains are transported by a given vehicle/machinery as opposed to other pathogenic protein assemblies that are transported and exported at different rates (Brahic et al., 2016). We report that both α -Syn strains promoted the formation of α -SynP structures resembling Lewy bodies and Lewy neurites. Nonetheless, ribbons were consistently more potent in inducing the accumulation of pathological α -SynP in human WT neurons. This is in agreement with observations we and others made in mouse (Peelaerts et al., 2015; Peng et al., 2018) and likely reflects a higher seeding propensity. Phenotypically distinct PrP-derived prion strains (scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease) are discriminated using several parameters, among which is the seeding propensity. While slow versus fast propagation phenotypic traits are associated with cellular PrP expression level, they are also linked to differences in biochemical properties of PrP aggregates or in their cell targeting properties (Le Dur et al., 2017). In that regard, we consider that ribbons and fibrils do harbor a distinct strain phenotype that is reminiscent of fast versus slow propagation properties.

In the absence of major morphological alteration or neuronal loss upon exposure to exogenous α -Syn strains we assessed early signs of neuronal dysfunctions. We observed alterations in Ca^{2+} homeostasis in human neuronal networks exposed to α -Syn strains reminiscent of synaptic failure. These alterations paralleled the progression in α -SynP accumulation. These results are coherent with

recent observations reporting functional defect in mouse hippocampal (Froula et al., 2018) and pyramidal (Kaufmann et al., 2016) neurons exposed to the fibrillar form of α -Syn. Moreover, focusing on neurons with large somatic inclusions, we observed a strong correlation between α -Syn seeding and mitochondria morphological impairment. A relationship between mitochondrial dysfunction and α -Syn aggregation was recently and independently evidenced (Di Maio et al., 2016; Grassi et al., 2018; Prots et al., 2018; Reeve et al., 2015). Our findings, in a relevant human cellular model, further highlight a role for α -Syn seeded aggregation in the development of functional defects likely initiating neurotoxicity associated with PD.

Finally, taking advantage of our microfluidic setup, we were able to evidence seeding of endogenous α -Syn in naive acceptor neurons after transfer of assemblies from donor neurons exposed to exogenous α -Syn seeds. This shows that prion-like propagation in neuronal networks comprises at minimum two distinct components, trans-neuronal spreading and intra-cellular seeding, the latter being the rate-limiting factor for amplification. Most importantly our results indicate that pathological forms of α -Syn actively disseminate and amplify in WT human neuronal networks by recruiting soluble α -Syn, a key step in the transmission of α -Syn pathogenic assemblies between human neurons in PD and related synucleinopathies.

The “Human Brain-on-Chips” functional platform we set up is uniquely suited to further assessing the prion-like spreading of aggregated α -Syn and its functional impact on neurons in distinct synucleinopathies. Because it is based on human neurons, expressing physiological levels of WT α -Syn, and preserves some degree of anatomical relevance, our *in vitro* model of a human neuronal network greatly extends the throughput at which many, if not all, aspects of prion-like spreading can be studied. A key advantage of our model is, in addition, that it bypasses the inter-species intrinsic differences in age-related neurodegenerative phenomena between rodents and humans. We are confident that such system will prove important as a predictive preclinical model to decipher the different components of the prion-like propagation (internalization, transport, nucleation) of α -Syn and of other protein aggregates in distinct neuropathological disorders and most importantly to later assess the efficiency of disease-modifying therapeutic approaches targeting key components of such pathways.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Generation of Neural Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells

hiPSC (i90c17 and 16, passage 30–50; Nicoleau et al., 2013) amplification and neural progenitor cell generation, differentiation, and



immunostaining were performed as described in [Supplemental Experimental Procedures](#).

α -Syn and HTTExon1Q48 Purification and Aggregation into Assemblies

Purification and quality control of human recombinant monomeric WT or S129A α -Syn and assembly into fibrils and ribbons and purification and assembly into fibrils of human recombinant HTTExon1Q48 were carried out as previously reported (Bousset et al., 2013) and described in [Supplemental Experimental Procedures](#).

Biochemical Analysis

Cells cultured in classical 24-well plates were scraped into lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.8 M NaCl; 1 mM EGTA; 10% [w/v] sucrose; 1% sarkosyl) supplemented with protease (Roche) and phosphatase (Sigma) inhibitor cocktails and solubilized at 37°C for 30 min. Filter trap and insolubility assay were performed as previously reported (Bousset et al., 2013) and described in [Supplemental Experimental Procedures](#).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, five figures, one table, and two videos and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.007>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.G. completed hiPSC neuronal differentiation, microfluidic network reconstructions, α -Syn propagation assays, confocal analysis, and Ca^{2+} imaging analysis. P.T. performed microfluidic network reconstructions, α -Syn propagation assays, and biochemical analysis. L.B. produced and characterized α -Syn assemblies and performed biochemical analysis. A.F. performed quality control of assemblies. P.L. contributed to sample preparation. R.M. supervised the biochemical works. A.P. supervised the iPSC assay development. J.-M.P. supervised the network reconstruction assay and α -Syn propagation experiments. S.G., P.T., R.M., J.-M.P., and A.P. wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J.L. Viovy, C. Villard, and the MMBM's group at Institut Pierre Gilles de Gennes (IPGG) for their useful comments and help in microfluidic chips design and fabrication. This work was supported by grants from the European Commission: MicroDEG, ERA-NET Neuron JTC2012 "Novel Methods" (J.-M.P. and A.L.P.), the CNRS (J.-M.P.), Inserm (A.L.P.), the Laboratoire d'Excellence Revive (ANR-10-LABX-73, A.L.P.), NeurATRIS (ANR-11-INBS-0011, A.L.P.), INGESTEM (ANR-11-INBS-0009, A.L.P.), European Commission H2020 Project Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research (JPND) ModelPolyQ grant 643417, A.L.P.). I-Stem is supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). We thank the IMAGIF facility for access to electron microscopes. L.B. and R.M. were supported by the EC Joint Program on Neurodegenerative Diseases (NeuTARGETs-ANR-14-JPCD-0002-02

and SYNACTION-ANR-15-JPWG-0012-03), a "Coup d'Élan à la Recherche Française" award from the Fondation Bettencourt Schueller, the Fondation de France (contract 2015–00060936) by Equipe FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) 2016 (DEQ2016033489), the Innovative Medicine Initiative 2 grant agreement No 116060 (IMPRiND, www.imprind.org) supported by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program and EFPIA, and the Fondation Simone et Cino Del Duca of the Institut de France. Dr. Peyrin is a founder and shareholder of MicrobrainBiotech.

Received: March 28, 2018

Revised: December 11, 2018

Accepted: December 11, 2018

Published: January 10, 2019

REFERENCES

- Abounit, S., Bousset, L., Loria, F., Zhu, S., de Chaumont, E., Pieri, L., Olivo-Marin, J.C., Melki, R., and Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes spread fibrillar alpha-synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J.* 35, 2120–2138.
- Apetri, M.M., Harkes, R., Subramaniam, V., Canters, G.W., Schmidt, T., and Aartsma, T.J. (2016). Direct observation of alpha-synuclein amyloid aggregates in endocytic vesicles of neuroblastoma cells. *PLoS One* 11, e0153020.
- Azeredo da Silveira, S., Schneider, B.L., Cifuentes-Diaz, C., Sage, D., Abbas-Terki, T., Iwatsubo, T., Unser, M., and Aebischer, P. (2009). Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of alpha-synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 18, 872–887.
- Betemps, D., Verchere, J., Brot, S., Morignat, E., Bousset, L., Gaillard, D., Lakhdar, L., Melki, R., and Baron, T. (2014). Alpha-synuclein spreading in M83 mice brain revealed by detection of pathological alpha-synuclein by enhanced ELISA. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 29.
- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Bockmann, A., Meier, B.H., et al. (2013). Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* 4, 2575.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., and Del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 112, 389–404.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., and Braak, E. (2003a). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.
- Braak, H., Rub, U., Gai, W.P., and Del Tredici, K. (2003b). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J. Neural Transm. (Vienna)* 110, 517–536.
- Brahic, M., Bousset, L., Bieri, G., Melki, R., and Gitler, A.D. (2016). Axonal transport and secretion of fibrillar forms of alpha-synuclein, Abeta42 peptide and HTTExon 1. *Acta Neuropathol.* 131, 539–548.
- Brundin, P., and Melki, R. (2017). Prying into the prion hypothesis for Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 37, 9808–9818.

- Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Alleaume-Butaux, A., Hjorth, J.J., Vignes, M., Schneider, B., Brugg, B., Viovy, J.L., and Peyrin, J.M. (2013). Synapto-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. *PLoS One* 8, e71103.
- Deleglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., Vignes, M., Viovy, J.L., Jacotot, E., Peyrin, J.M., et al. (2014). beta-Amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 145.
- Desplats, P., Lee, H.J., Bae, E.J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., and Lee, S.J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106, 13010–13015.
- Di Maio, R., Barrett, P.J., Hoffman, E.K., Barrett, C.W., Zharikov, A., Borah, A., Hu, X., McCoy, J., Chu, C.T., Burton, E.A., et al. (2016). α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* 8, 342ra378.
- Dinh, N.D., Chiang, Y.Y., Hardelauf, H., Baumann, J., Jackson, E., Waide, S., Sinaiske, J., Frimat, J.P., van Thriel, C., Janasek, D., et al. (2013). Microfluidic construction of minimalistic neuronal co-cultures. *Lab Chip* 13, 1402–1412.
- Febbraro, F., Sahin, G., Farran, A., Soares, S., Jensen, P.H., Kirik, D., and Romero-Ramos, M. (2013). Ser129D mutant alpha-synuclein induces earlier motor dysfunction while S129A results in distinctive pathology in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 56, 47–58.
- Feyeux, M., Bourgois-Rocha, F., Redfern, A., Giles, P., Lefort, N., Aubert, S., Bonnefond, C., Bugi, A., Ruiz, M., Deglon, N., et al. (2012). Early transcriptional changes linked to naturally occurring Huntington's disease mutations in neural derivatives of human embryonic stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3883–3895.
- Flavin, W.P., Bousset, L., Green, Z.C., Chu, Y., Skarpathiotis, S., Chaney, M.J., Kordower, J.H., Melki, R., and Campbell, E.M. (2017). Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins. *Acta Neuropathol.* 134, 629–653.
- Freundt, E.C., Maynard, N., Clancy, E.K., Roy, S., Bousset, L., Sourigues, Y., Covert, M., Melki, R., Kirkegaard, K., and Brahic, M. (2012). Neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein fibrils through axonal transport. *Ann. Neurol.* 72, 517–524.
- Froula, J.M., Henderson, B.W., Gonzalez, J.C., Vaden, J.H., McLean, J.W., Wu, Y., Banumurthy, G., Overstreet-Wadiche, L., Herskowitz, J.H., and Volpicelli-Daley, L.A. (2018). alpha-Synuclein fibril-induced paradoxical structural and functional defects in hippocampal neurons. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 35.
- Gaspard, N., Bouschet, T., Herpoel, A., Naeije, G., van den Ameel, J., and Vanderhaeghen, P. (2009). Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* 4, 1454–1463.
- George, S., Rey, N.L., Reichenbach, N., Steiner, J.A., and Brundin, P. (2013). alpha-Synuclein: the long distance runner. *Brain Pathol.* 23, 350–357.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Del Tredici, K., and Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 13–24.
- Gorbatyuk, O.S., Li, S., Sullivan, L.F., Chen, W., Kondrikova, G., Manfredsson, F.P., Mandel, R.J., and Muzyczka, N. (2008). The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 763–768.
- Grassi, D., Howard, S., Zhou, M., Diaz-Perez, N., Urban, N.T., Guerrero-Given, D., Kamasawa, N., Volpicelli-Daley, L.A., LoGrasso, P., and Lasmezas, C.I. (2018). Identification of a highly neurotoxic alpha-synuclein species inducing mitochondrial damage and mitophagy in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 115, E2634–E2643.
- Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., and Daley, G.Q. (2011). Induced pluripotent stem cells—opportunities for disease modeling and drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 915–929.
- Guo, J.L., Covell, D.J., Daniels, J.P., Iba, M., Stieber, A., Zhang, B., Riddle, D.M., Kwong, L.K., Xu, Y., Trojanowski, J.Q., et al. (2013). Distinct alpha-synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell* 154, 103–117.
- Hansen, C., Angot, E., Bergstrom, A.L., Steiner, J.A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T.F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., et al. (2011). alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J. Clin. Invest.* 121, 715–725.
- Jellinger, K.A. (2012). Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Mov. Disord.* 27, 8–30.
- Kaufmann, T.J., Harrison, P.M., Richardson, M.J., Pinheiro, T.J., and Wall, M.J. (2016). Intracellular soluble alpha-synuclein oligomers reduce pyramidal cell excitability. *J. Physiol.* 594, 2751–2772.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., and Olanow, C.W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* 14, 504–506.
- Le Dur, A., Lai, T.L., Stinnakre, M.G., Laisne, A., Chenais, N., Rako-tobe, S., Passet, B., Reine, F., Soulier, S., Herzog, L., et al. (2017). Divergent prion strain evolution driven by PrP(C) expression level in transgenic mice. *Nat. Commun.* 8, 14170.
- Lee, H.J., Suk, J.E., Bae, E.J., Lee, J.H., Paik, S.R., and Lee, S.J. (2008). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1835–1849.
- Li, J.Y., Englund, E., Holtzman, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Bjorklund, A., et al. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 14, 501–503.
- Loria, F., Vargas, J.Y., Bousset, L., Syan, S., Salles, A., Melki, R., and Zurzolo, C. (2017). alpha-Synuclein transfer between neurons and astrocytes indicates that astrocytes play a role in degradation rather than in spreading. *Acta Neuropathol.* 134, 789–808.
- Luk, K.C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2012a). Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338, 949–953.
- Luk, K.C., Kehm, V.M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2012b). Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J. Exp. Med.* 209, 975–986.
- Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D.M., and Hasegawa, M. (2013). Prion-like



- spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 136, 1128–1138.
- Melki, R. (2015). Role of different alpha-synuclein strains in synucleinopathies, similarities with other neurodegenerative diseases. *J. Parkinsons Dis.* 5, 217–227.
- Nicoleau, C., Varela, C., Bonnefond, C., Maury, Y., Bugi, A., Aubry, L., Viegas, P., Bourgois-Rocha, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2013). Embryonic stem cells neural differentiation qualifies the role of Wnt/beta-catenin signals in human telencephalic specification and regionalization. *Stem Cells* 31, 1763–1774.
- Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van den Haute, C., Melki, R., and Baekelandt, V. (2015). alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522, 340–344.
- Peng, C., Gathagan, R.J., Covell, D.J., Medellin, C., Stieber, A., Robinson, J.L., Zhang, B., Pitkin, R.M., Olufemi, M.F., Luk, K.C., et al. (2018). Cellular milieu imparts distinct pathological alpha-synuclein strains in alpha-synucleinopathies. *Nature* 557, 558–563.
- Peyrin, J.M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., Betuing, S., Pietri, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., et al. (2011). Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab Chip* 11, 3663–3673.
- Pieri, L., Chafey, P., Le Gall, M., Clary, G., Melki, R., and Redeker, V. (2016). Cellular response of human neuroblastoma cells to alpha-synuclein fibrils, the main constituent of Lewy bodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 8–19.
- Prots, I., Grosch, J., Brazdis, R.M., Simmnacher, K., Veber, V., Havlicek, S., Hannappel, C., Krach, F., Krumbiegel, M., Schutz, O., et al. (2018). alpha-Synuclein oligomers induce early axonal dysfunction in human iPSC-based models of synucleinopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 115, 7813–7818.
- Reeve, A.K., Ludtmann, M.H., Angelova, P.R., Simcox, E.M., Horrocks, M.H., Klenerman, D., Gandhi, S., Turnbull, D.M., and Abramov, A.Y. (2015). Aggregated alpha-synuclein and complex I deficiency: exploration of their relationship in differentiated neurons. *Cell Death Dis.* 6, e1820.
- Rutherford, N.J., Brooks, M., and Giasson, B.I. (2016). Novel antibodies to phosphorylated alpha-synuclein serine 129 and NFL serine 473 demonstrate the close molecular homology of these epitopes. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 80.
- Sacino, A.N., Brooks, M., Thomas, M.A., McKinney, A.B., Lee, S., Regenhardt, R.W., McGarvey, N.H., Ayers, J.I., Notterpek, L., Borchelt, D.R., et al. (2014a). Intramuscular injection of alpha-synuclein induces CNS alpha-synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 111, 10732–10737.
- Sacino, A.N., Brooks, M., Thomas, M.A., McKinney, A.B., McGarvey, N.H., Rutherford, N.J., Ceballos-Diaz, C., Robertson, J., Golde, T.E., and Giasson, B.I. (2014b). Amyloidogenic alpha-synuclein seeds do not invariably induce rapid, widespread pathology in mice. *Acta Neuropathol.* 127, 645–665.
- Sacino, A.N., Brooks, M.M., Chakrabarty, P., Saha, K., Khoshbouei, H., Golde, T.E., and Giasson, B.I. (2016). Proteolysis of alpha-synuclein fibrils in the lysosomal pathway limits induction of inclusion pathology. *J. Neurochem.* 140, 662–678.
- Salvesen, L., Winge, K., Brudek, T., Agander, T.K., Lokkegaard, A., and Pakkenberg, B. (2017). Neocortical neuronal loss in patients with multiple system atrophy: a stereological study. *Cereb. Cortex* 27, 400–410.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840.
- Sugiura, K., Hashizume, Y., Kume, A., and Takahashi, A. (1995). Distribution of neuronal cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Nagoya J. Med. Sci.* 58, 117–126.
- Tenreiro, S., Eckermann, K., and Outeiro, T.F. (2014). Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Front. Mol. Neurosci.* 7, 42.
- Uchihara, T., and Giasson, B.I. (2016). Propagation of alpha-synuclein pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol.* 131, 49–73.
- Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., and Lee, V.M. (2016). Addition of exogenous alpha-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous alpha-synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat. Protoc.* 9, 2135–2146.
- Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., Patel, T.P., Tanik, S.A., Riddle, D.M., Stieber, A., Meaney, D.F., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2011). Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 72, 57–71.
- Yau, Y., Zeighami, Y., Baker, T.E., Larcher, K., Vainik, U., Dadar, M., Fonov, V.S., Hagmann, P., Griffa, A., Mistic, B., et al. (2018). Network connectivity determines cortical thinning in early Parkinson's disease progression. *Nat. Commun.* 9, 12.

Stem Cell Reports, Volume 12

Supplemental Information

Propagation of α -Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network

Simona Gribaudo, Philippe Tixador, Luc Bousset, Alexis Fenyi, Patricia Lino, Ronald Melki, Jean-Michel Peyrin, and Anselme L. Perrier

Supplemental information

SUPPLEMENTAL ITEMS

Supplemental video 1 and 2. *Axonal Transport of α -Syn ribbons (video1) or fibrils (video2) visualized at the exit of the microgrooves in the distal chamber*, Related to Figure 2. Thirty days in vitro reconstructed human cortical neuronal networks were loaded in the proximal chamber with 500 nM Atto-550 labelled ribbons or fibrils. The movements of the fluorescent assemblies were then imaged in the distal chamber, at the exit of the microgrooves, 24h after exposure. Fluorescent images were acquired every 600 ms for 5 min and were superimposed on a phase-contrast image acquired at the beginning of the acquisition (scale bar: 50 μ m; timestamp: sec).

SUPPLEMENTAL FIGURES

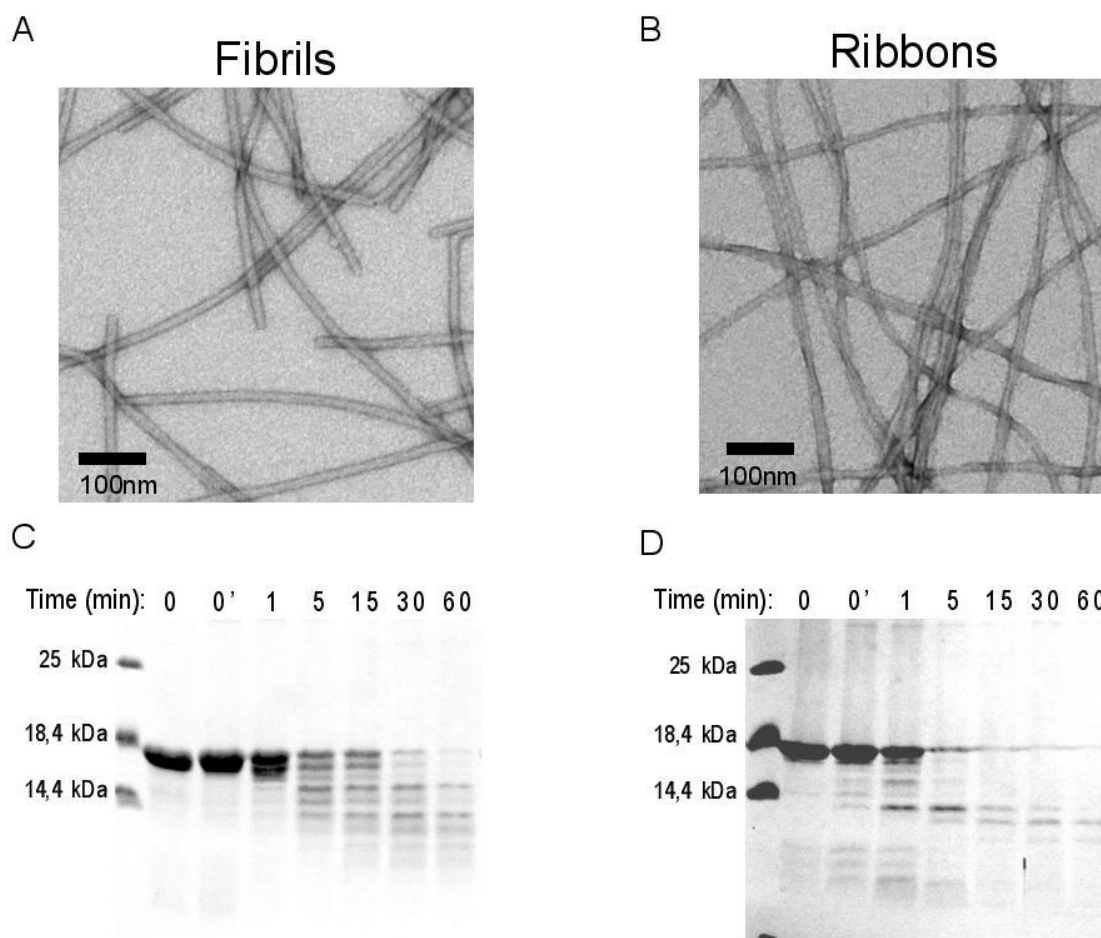


Figure S1. *Quality control and characterization of fibrils and ribbons*, Related to Figure 2-7. Fibrils and ribbons were generated exactly as described in Bousset et al., 2013 and as described in the materials and methods section. The resulting assemblies were adsorbed on 200 mesh carbon coated electron microscopy grids and imaged by transmission electron microscopy after negative staining (A and B). Besides differing through their shapes, the polymorphs/strains fibrils (cylindrical) and ribbons (flat) differ through their limited proteolytic patterns. Thus, the resulting fibrils (C) and ribbons (D) (mg/ml) were subjected to degradation by proteinase K. Aliquots were removed before (0), immediately (0') or at the indicated time (in minutes) after addition of proteinase K, denatured in boiling Laemmli buffer for 5 minutes at 90°C and subjected to SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels. The Coomassie stains of the SDS-PAGE are shown (C and D). The patterns in C and D are

characteristic of the polymorphs/strains fibrils and ribbons, respectively (Bousset et al., 2013). The pre-stained molecular weight markers are shown on the left.

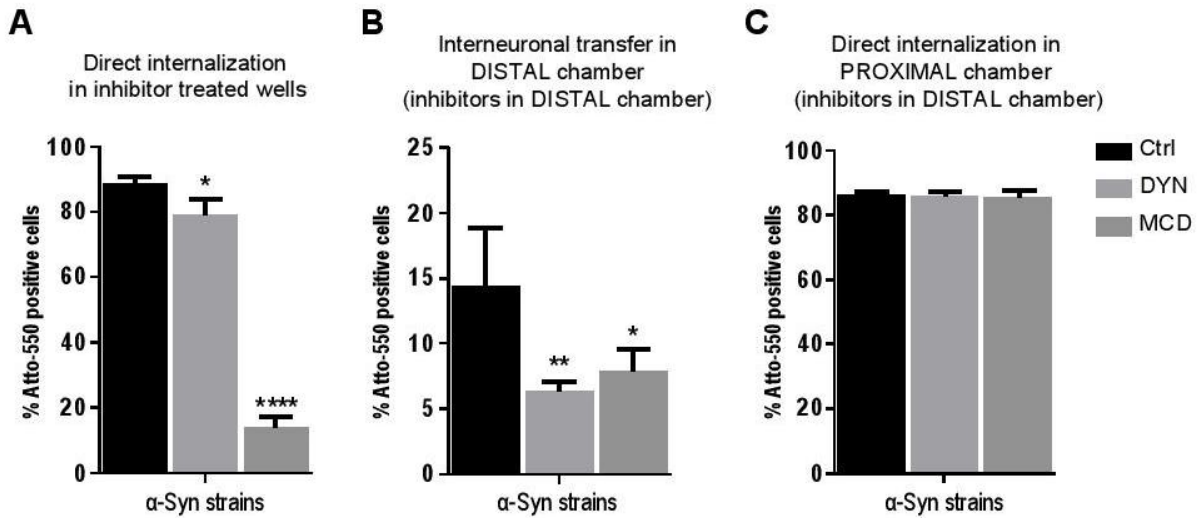
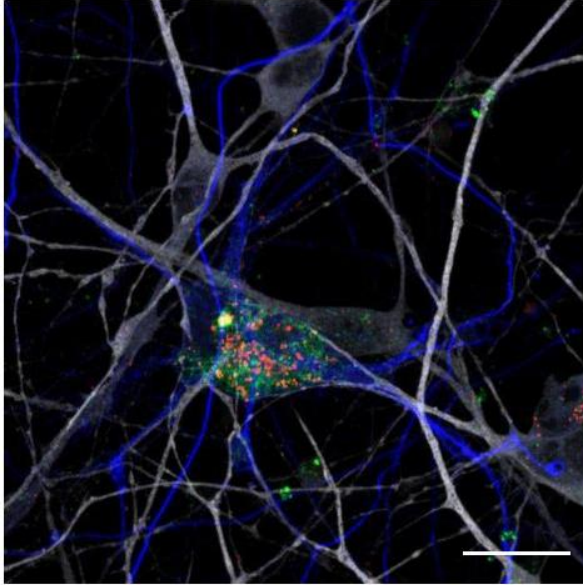


Figure S2. Inhibition of receptor/clathrin-dependent endocytosis or fission of endocytic vesicles reduces the direct and indirect internalization of α -Syn strains, Related to Figure 2. A-C: Before strains addition, neurons were pre-treated for 1 hour with Monocadaverin (MCD, 70 μ M) or Dynasore (DYN, 80 μ M) and analysis were performed 24 hours later. A: The direct uptake of Atto-550 α -Syn strains (fibrils and ribbons) from the medium was strongly reduced by application of MCD while application of DYN only partially reduced the uptake of the assemblies. B-C: taking advantage of the microfluidic system, the effect of MCD and DYN was tested on the capacity of secondary neurons located in the distal chamber to uptake Atto-550 strains from axon of “donor” neurons. B: Both MCD and DYN application reduced the proportion of neurons in the distal chamber with internalized exogenous assemblies. C: the proportion of Atto-positive neurons in the proximal chamber did not change during inhibitors application in the distal chamber ($F=473.6$ in A, $F=8.10$ in B, ANOVA with Dunnett’s post-hoc tests). * represents $p < 0.05$, ** and $^{\circ\circ}$ $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. Data are mean \pm SEM, $n=3$ independent experiments.

A GFAP Fibrils LAMP1 MAP2



B S100 β Ribbons α -SynP MAP2

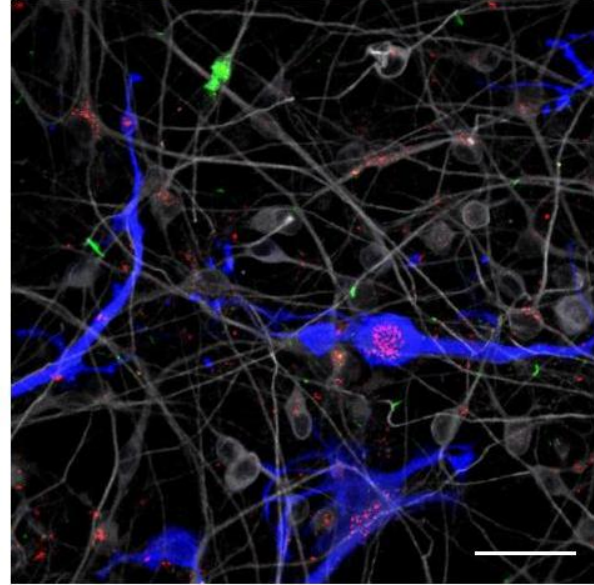


Figure S3. Immunofluorescence analysis of human glial cells exposed to α -Syn assemblies, Related to Figure 3. A: Fluorescence confocal imaging of LAMP1 (green) in human cortical culture (MAP2, grey) 30 days after exposure to 500 nM Atto-550 labelled (red) α -Syn strains. Representative images showing that Atto-550 assemblies in lysosome (LAMP1+) of GFAP+ (blue) glial cells. B: Fluorescence confocal imaging of endogenous α -SynP (green) in human cortical culture (MAP2, grey) 30 days after exposure to 500 nM Atto-550 labelled (red) α -Syn ribbons. Representative images showing that α -SynP inclusions are not found in S100 β -positive (blue) glial cells. Scale bar 20 μ m in A, 40 μ m in B.

MAP2 Ribbons O4 α -SynP

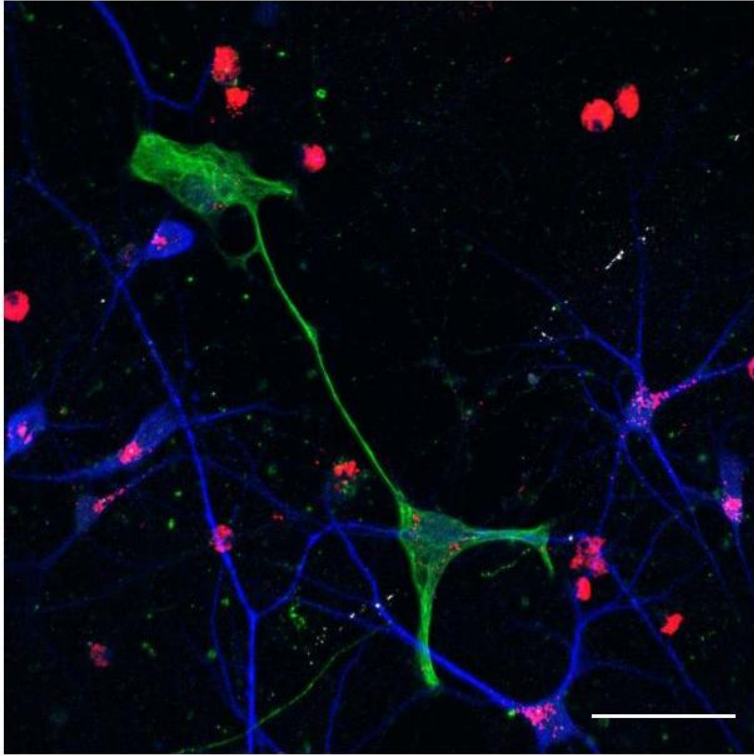


Figure S4. *Immunofluorescence analysis of human neuronal cultures containing O4-positive oligodendrocytes precursor cells exposed to α -Syn assemblies, Related to Figure 3. Fluorescence confocal imaging of O4 (green) in human cortical culture (MAP2, blue) 21 days after exposure to 500 nM Atto-550 labelled (red) α -Syn fibrillar assemblies. Representative images showing the presence of Atto-550 assemblies in O4 positive cells; α -SynP (grey) inclusions are never found in O4-positive (green) cells. Scale bar 40 μ m*

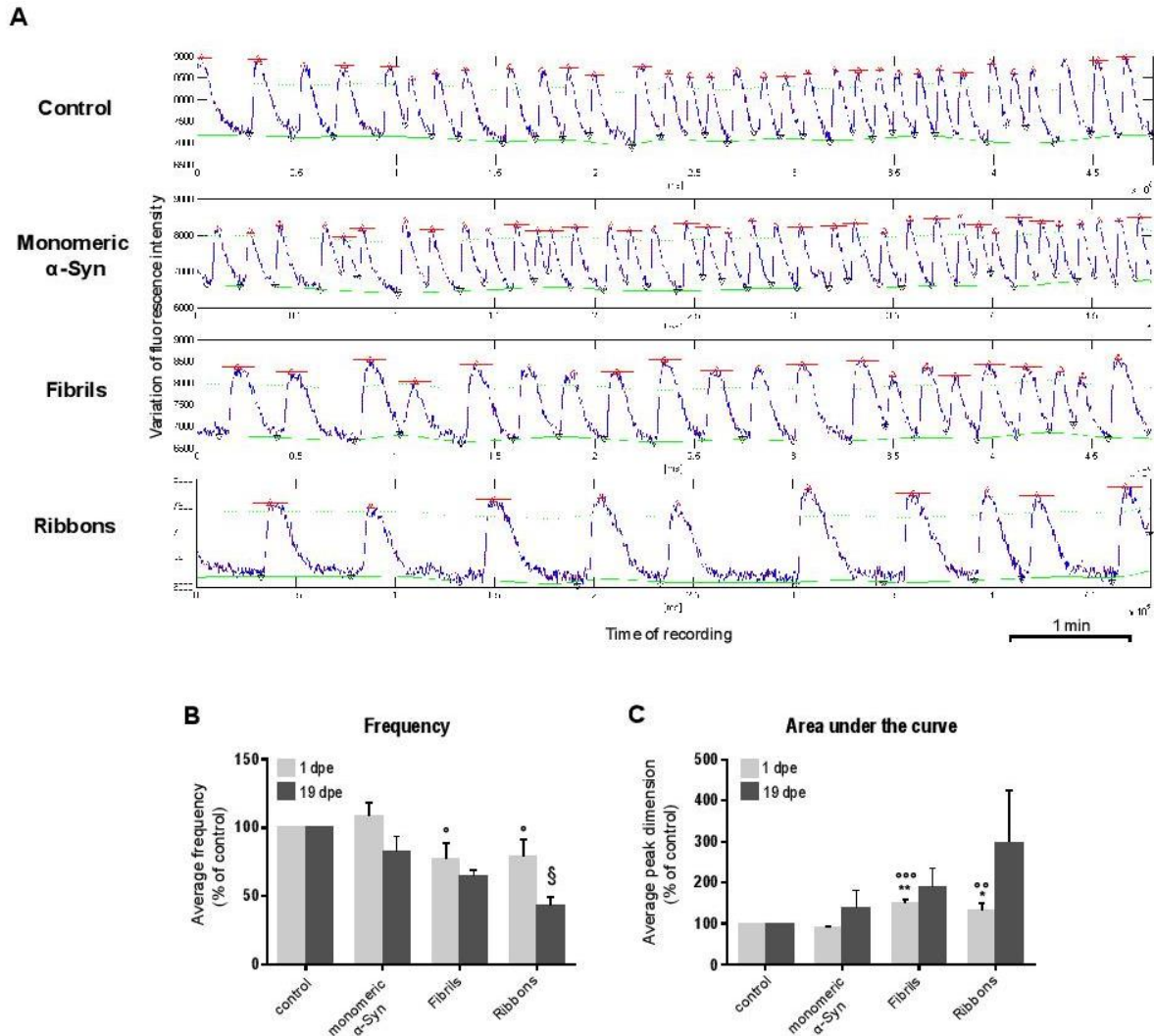


Figure S5. Alterations of Ca^{2+} oscillations in human neuronal cultures treated with exogenous α -Syn assemblies, Related to Figure 6. A: Representatives traces of spontaneous Ca^{2+} oscillations obtained by whole well recording followed by FDSS waveform analysis of Fluo4 loaded cortical human neuronal cultures. Cells were treated at 5 weeks and Ca^{2+} recording was performed 19 days post exposure (dpe) to monomeric α -Syn, fibrils, and ribbons. Control cells were unexposed. B-C: Average frequency (B) and average peak dimension (C, area under the curve) in mature neuronal networks (recording performed at 8 weeks) at 1 or 19 dpe. Already at 1 dpe, ribbons and fibrils exposure triggered decrease in frequency (B) and increase in the AUC (C) of Ca^{2+} oscillation in human neuronal cultures ($F=8.36$ in B, $F=28.65$ in C, ANOVA with Tukey's post-hoc tests). Stars indicate significant difference of 1 dpe treated neurons vs control; empty dots indicate significant difference of 1 dpe treated neurons vs monomeric α -Syn. * and \circ represent $p < 0.05$, ** and $\circ\circ$ $p < 0.01$, $\circ\circ\circ$ $p < 0.001$. These variations tend to amplify with time. In particular decrease in peak frequency between 1 and 19 dpe (B) is significant in ribbons-treated neuronal cultures ($F=8.113$, $p=0.0015$, ANOVA with Sidak's post-hoc test, indicated by the paragraph sign). Data are presented as mean percentage compared to control \pm SEM, $n=3$ independent experiments for each exposure time.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Microfluidic chips fabrication

Three compartmented microfluidic chambers were designed and produced as previously described (Deleglise et al., 2013). After bonding PDMS chips to glass coverslip with a plasma generator, the chips were coated with a solution of poly-Ornithine overnight (0.002% final concentration, P4957 Sigma; St. Louis, MO, USA). Chips were then washed in PBS and further coated with Laminin (4 μ g/ml final concentration, 23017015, Invitrogen) for at least 4 hours.

Neural induction and differentiation of hiPSCs

The i90c17 and 16 human iPS cells line (passage 30-50 (Nicoleau et al., 2013)) were maintained on L7 (Lonza) matrix and grown in STEMPRO medium (Invitrogen) in presence of FGF2 (10 ng/ml, Peprotech). Cultures were fed daily and manually passaged every 4–5 days. For neural differentiation, hiPSC colonies were treated as previously described (Nicoleau et al., 2013). N2B27 medium was supplemented with 0.1 μ M LDN-193189 (Sigma), 20 μ M SB-431542 (Tocris), 1 μ M XAV-939 (Tocris) for the first 10 days and with 1 μ M XAV-939 only starting from day 10. At day 18, cells were enzymatically dissociated using Accutase (Invitrogen) and further expanded in N2B27 supplemented with FGF2 (20ng/ml), EGF (10 ng/ml, R&D systems) and BDNF (10 ng/ml Peprotech). Cells were passaged up to 6 times every 3-4 days. For banking, neuronal precursor (NSC) were resuspended at 8x10⁶ cells/ml in “freezing medium” (90% fetal calf serum 10% DMSO), frozen and stored in liquid nitrogen vapor at -150°C.

Neuronal differentiation of hiPSC-derived NSCs

NSC were suspended in N2B27 medium to a final density of 80x10⁶ cells/mL for the proximal compartment and 20x10⁶ cells/ml for the distal compartment into poly-L-ornithine/laminin coated microfluidic chips or at 10⁶ cells/ml for culture in regular culture plate. For the final differentiation cells were cultivated in presence of BDNF (20 ng/ml), cAMP (100 μ M, Sigma) and valproic acid (0.5 mM, Sigma). DAPT (5 μ M, Tocris) was added to the culture for the first 2 weeks. Medium was change every 5 days.

Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% PFA/4% sucrose and further permeabilized with 0.1% Triton X-100 and 2% BSA in PBS. To assess α -Syn detergent insolubility by immunofluorescence, samples were alternatively fixed with 4% PFA in presence of 1% Triton X-100 as previously described (Volpicelli-Daley et al., 2016). Primary antibodies (listed in Table S1) were then added and the samples incubated at 4°C overnight in PBS. Species specific secondary antibodies coupled to Alexa 350, 488, 555 and 647 (1/1000, Invitrogen) and DAPI counterstain were applied for 1 hour at room temperature.

Image acquisition and analysis

Confocal analyses were performed using a ZEISS LSM 880 Confocal Laser Scanning Microscope with Airyscan module (Zen software). Quantitative and live imaging analyses were acquired with an Axio-observer Z1 (Zeiss) fitted with a cooled CCD camera (ORCA-Flash4, Hamamatsu, Coolsnap HQ2, Roper Scientific, Metamorph software (Molecular Imaging)) for widefield fluorescence acquisition or with an Evolve EMCCD camera (Zeiss), coupled to a spinning disk system (Nipkow, CSU-X1M 5000, Zeiss). Quantitative immunofluorescence analysis was performed on randomly selected visual fields from three independent microfluidic devices using ImageJ. On average, 3 visual fields were acquired per each microfluidic chamber and a total of 50 cells were counted per field. Data are presented as mean \pm SEM. The quantification of α -SynP in neurons was estimated by the ratio between the area occupied by α -SynP and MAP2 in the somatic and proximal dendrites compartments of neurons exposed to either fibrils or ribbons. Data are presented as mean \pm SD.

α -Syn and HTTExon 1Q48 purification and aggregation into assemblies

A variant human α -Syn where Serine 129 residue was changed to Alanine (S129A α -Syn) was generated by site directed mutagenesis. This variant cannot be phosphorylated in neurons on S129, the main phosphorylation site for α -Syn. Purification and quality control of human recombinant monomeric WT or S129A α -Syn and assembly into fibrils and ribbons were carried out as previously described (Bousset et al., 2013). The purification and

assembly into fibrils of human recombinant HTTExon1Q48 was performed as described (Monsellier et al., 2015). WT and S129A α -Syn fibrils, ribbons and HTTExon1Q48, preformed fibrils were pelleted and washed with PBS buffer, pH 7.4 and further labelled with a two molar excess of NHS-ester ATTO 550 (AttoTec) according to manufacturer's recommendations. Preformed assemblies were fragmented by sonication for 20 min in 2-ml Eppendorf tubes in a Vial Tweeter powered by an ultrasonic processor UIS250v (250 W, 2.4 kHz; Hielscher Ultrasonic, Teltow, Germany). Following labelling, the unreacted dye was removed using a desalting column (PD10, GE Healthcare) equilibrated in PBS buffer, pH 7.4.

For transmission electron microscopy, the assemblies were adsorbed on 200 mesh carbon coated electron microscopy grids and imaged after negative staining. For degradation by proteinase K, aliquots of fibrils and ribbons (mg/ml) were removed before (0), immediately (0') or at the indicated time (in minutes) after addition of proteinase K, denatured in boiling Laemmli buffer for 5 minutes at 90°C, subjected to SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels and stained by Coomassie coloration.

Exposure of human neuronal cells to monomeric α -Syn, α -Syn strains and fibrillar HTTExon1Q48

Thirty days after seeding, neuronal cultures in plates or microfluidics were exposed to 500 nM of Atto550 labelled α -Syn fibrils, ribbons and monomers and to fibrillar HTTExon1Q48 with a 24 hours pulse, and then washed. The occurrence of de novo formation of pathological α -Syn was then assessed by biochemical and immunofluorescence approaches at 7, 15 and 30 days post-exposure to the different samples. For longitudinal analysis of exogenous assemblies transport/transfer, proximal chambers were loaded with 500 nM of Atto550 labelled α -Syn fibrils, ribbons and monomers with a 24 hours pulse. To prevent passive diffusion of assemblies, hydrostatic pressure was applied by adding medium excess in the reservoirs of recipient chambers. Loaded networks were imaged 1, 7, 15 and 21 days after addition of assemblies. To analyze axonal transport, time lapse imaging (5 minutes films, with time interval of 600 ms) was performed 24 hours post loading with an inverted Zeiss spinning disk system. Enhanced projections of the video sequences to identify and track axonal/fluorescent punctae paths were performed. For each path/axon segment, a kymograph representation was extracted with ImageJ software plug-In "Multiple Kymograph" and average velocity pattern as well as average path lengths of fluorescent punctae were then determined.

Analysis of endocytosis inhibitors

The contribution of receptor/clathrin-dependent endocytosis (Schlegel et al., 1982) or fission of endocytic vesicles (Macia et al., 2006) to the direct uptake of α -Syn strains by human cortical neurons was assessed. To this end, cells in classic p24 vessel were pretreated for 1 hour with 70 μ M monodansylcadaverine (Sigma-Aldrich) or 80 μ M dynasore (Tocris Bioscience Bristol, UK) and imaged 24 h after their exposure to Atto-550 Ribbons or Fibrils, at 500 nM, after washing. To analyze the effect of those two pharmacological inhibitors on the interneuronal transfer of fibrils and ribbons, our microfluidic setup was used. The neurons resident in the distal chamber (acceptor neurons) were pretreated with monodansylcadaverine or dynasore for 1 hour before exposing the cells in the proximal chamber (donor neurons) to 0.8 μ M of fibrils or ribbon, in order to maximize the % of spreading between the neuronal networks. The cells in the 2 chamber were imaged 24 hours later.

Biochemical Analysis

Cells cultured in classic 24 well plates were scraped into lysis buffer (LB; 20mM Tris-HCl pH 7.5; 0,8M NaCl; 1mM EGTA; 10% (w/v) sucrose; 1% sarkosyl) supplemented with protease (Roche) and phosphatase (Sigma) inhibitor cocktails and solubilized at 37°C for 30 min. Lysates were then precleared by centrifugation at 1000 g for 10 min and the supernatants were retained for further analyses. Filter trap and insolubility assay were performed as previously described (Bousset et al., 2013). The primary antibodies used are listed in Table 1. After 4 washes with TBS-T, the membranes were further incubated for 1h with appropriate HRP conjugated secondary antibody diluted (1: 2000) in blocking buffer and then washed 4 times with TBS-T. Immunoblots were revealed with West Femto ECL (Pierce). Chemiluminescence was recorded on LAS-3000 imaging system (FUJIFILM) or Chemidoc (Bio-Rad) and quantified with image J.

Ca²⁺ imaging analysis

Human cortical neurons were cultured in 384 well plates at a density of 80.000 cells per cm². For Ca²⁺ imaging experiments, cells were loaded for 15 minutes with Fluo4 probe (1 μ M, Invitrogen) in HBSS physiological solution then washed 3 times. For both 1 and 19 dpe studies, Ca²⁺ imaging recording were performed on human neuronal cultures at 8 weeks of final differentiation (5 weeks + 19 days, or 8 weeks + 1 day). Spontaneous Ca²⁺ oscillations were recorded using the FDSS 600 Hamamatsu imaging-based plate reader, for duration of 8

minutes at a time interval of 0.4 seconds. Analyses of the frequency, amplitude and area under the curve of the Ca^{2+} oscillations for each well were performed using the FDSS Waveform analysis software.

Analysis of mitochondria morphologies

For mitochondria morphological analysis, neuronal culture in μ fluidic devices were treated at 4 weeks of differentiation and analyzed 21 days after exposure to fibrils, ribbons or monomeric α -Syn. Images were acquired by confocal microscope. For ribbons and fibrils treated neurons, cells were selected based on the presence of α -SynP somatic inclusion (α -SynP+ cells). The α -SynP- cells belonging to the same culture and surrounding the α -SynP+ neurons (e.g. not presenting α -SynP somatic inclusion but loaded with Atto-550 fibrils or ribbons) were analyzed separately. For unexposed neurons or neurons exposed to monomeric α -Syn, cells were acquired randomly. For the morphological analysis, for each cell (96 for RIB, 84 for FIB, 90 for monomeric and 65 for ctrl, from n=3 independent experiments) a score was assigned based on the MTCO2 staining, MAP2 used to identify the neurons. The score range from 0 to 3 for each category that include i) fusion, ii) fragmented/fission and iii) donut-shaped/condensed mitochondria. Classified cells were subsequently evaluated on α -SynP staining, and further distinguished in α -SynP+ or α -SynP-.

Statistical analyses

Figure 2A and 2B, Interneuronal spreading of α -Syn assemblies:

Two-way ANOVA: for proximal chamber (Fig 2A), F=40.50 (interaction), F=489.7 (treatment); for distal chamber (Fig 2B), F=6.237 (interaction), F=97.74 (treatment). Data are presented as mean \pm SD, n=4 independent experiments. Multiple pairs of conditions show significantly different % of Atto-550 positive cells in proximal and distal chamber (Tukey's post-hoc tests):

Distal chamber (2B):

- Time effect: fibrils 1 vs 15 and 21 dpe (p<0.0001), 7 vs 15 and 21 (p<0.001); ribbons 1 vs 7 (p<0.01), 1 vs 15 and 21 (p<0.0001), 7 vs 15 and 21 (p<0.0001).
- Strains effect: fibrils and ribbons vs monomeric α -Syn at 1 dpe (p<0.01), 7, 15 and 21 dpe (p<0.0001); fibrils vs ribbons never significant.

Proximal chamber (2A):

- Time effect: monomeric α -Syn 1 vs 7, 15, 21 (p<0.0001), 7 vs 15 (p<0.5) and 21 (p<0.01); fibrils never significant; ribbons 1 vs 15 and 21 (p<0.01), 7 vs 15 and 21 (p<0.01).
- Strains effect: fibrils and ribbons vs monomeric α -Syn at 1, 7, 15, 21 dpe (p<0.001); fibrils vs ribbons never significant.

Figure 5C, Time dependent effect of α -Syn strains exposure:

Two-way ANOVA, F=16.55 (interaction), F=24.98 (treatment). Data are presented as mean \pm SD, n=3 independent experiments. Multiple pairs of conditions show significant increase of the ratio between α -SynP area/MAP2 area over time for the 2 strains (Tukey's post-hoc tests):

- Time effect: fibrils 7 dpe vs 30 dpe (p<0.05); ribbons 7 or 15 dpe vs 30 dpe (p<0.001).
- Strain's effect (at 30 dpe): fibrils vs control (p<0.05), ribbons vs control (p<0.001), ribbons vs fibrils (p<0.001).

Figure 6A-C, Alteration in calcium homeostasis:

ANOVA, F=23.83 in A, F=7.14 in C, with Tukey's post-hoc tests. Stars indicate significant difference of α -Syn strains treated neurons vs control; empty dots indicate significant difference of α -Syn strains treated neurons vs monomeric α -Syn. Data are presented as mean \pm SEM, 4 wells per experiment, n=3 independent experiments.

Figure 6D-E, Alteration in mitochondria morphologies:

For each cell (96 for RIB, 84 for FIB, 90 for monomeric and 65 for ctrl, from n=3 independent experiments, data are presented as mean \pm SEM), a score was assigned (from 0 to 3) to each category and the cells were subsequently classified as α -SynP+ or α -SynP-.

- Comparison of treated neurons vs control: ANOVA, F=4.47 in D, F= 5.64 in E, F=5.60 in F, with Dunnett's post-hoc tests; differences are indicated by stars.
- Comparison of α -SynP+ vs α -SynP- cells present in the same culture: ANOVA, F=3.80 in D, F= 8.86 in E, F=5.11 in F, with Sidak's post-hoc tests; differences are indicated by empty dots.

Table S1. List of primary antibodies, Related to Figure 1-7.

Primary antibodies	Dilution IF	Dilution WB	Species	Provider	Reference number
BIIL-TUB	1/1000		ms monoclonal	BioLegend	MMS-435P
BIIL-TUB	1/1000		chick polyclonal	Aves Labs	---
BRN2	1/800		goat monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-6029
CTIP2	1/500		rat monoclonal	abcam	ab18465
CUX2	1/2000		rb poly clonal	abcam	ab130395
GABA	1/1000		rb poly clonal	Sigma	A2052
GFAP	1/5000		rb poly clonal	DakoCytomatic	Z0334
HSP70	1/200		ms monoclonal	ThermoFisher Scientific	Clone 4G4, MA3-009
LAMP1	1/300		ms monoclonal	Abcam	ab25630
LAMP2	1/300		ms monoclonal	Abcam	ab25631
MAP2	1/500		ms monoclonal	Sigma	M1406
MAP2	1/500		chick polyclonal	BioLegend	822501
MTCO2	1/400		ms monoclonal	Abcam	ab3298
phospho S129 α -Syn	1/500		rb polyclonal	Abcam	ab59264
phospho S129 α -Syn	1/500	1/5000	rb monoclonal	Abcam	EP1536Y, ab51253
phospho S129 α -Syn		1/5000	ms monoclonal	Abcam	Clone 81A, ab184674
PSD95	1/500		ms monoclonal	Abcam	ab2723
S100- β	1/500		ms monoclonal	Abcam	ab 11178
SQSTM1-p62	1/400		ms monoclonal	Abcam	ab56416
Synaptophysin	1/1000		rb poly clonal	Millipore	AB16659
TBRI	1/500		rb poly clonal	abcam	ab31940
α -Synuclein	1/500		ms monoclonal	ThermoFisher Scientific	Clone sy n211, MS-1572
α -Synuclein	1/500	1/5000	ms monoclonal	BD Bioscience	Clone 42, 610787
Ubiquitin	1/500		ms monoclonal	Abcam	ab7254
VGLUT1	1/1000		rb poly clonal	Synaptic System	135 303

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Bockmann, A., Meier, B.H., *et al.* (2013). Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* 4, 2575.
- Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Alleaume-Butaux, A., Hjorth, J.J., Vignes, M., Schneider, B., Brugg, B., Viovy, J.L., and Peyrin, J.M. (2013). Synapto-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. *PLoS One* 8, e71103.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 10, 839-850.
- Monsellier, E., Redeker, V., Ruiz-Arlandis, G., Bousset, L., and Melki, R. (2015). Molecular interaction between the chaperone Hsc70 and the N-terminal flank of huntingtin exon 1 modulates aggregation. *J Biol Chem* 290, 2560-2576.
- Nicoleau, C., Varela, C., Bonnefond, C., Maury, Y., Bugi, A., Aubry, L., Viegas, P., Bourgois-Rocha, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2013). Embryonic Stem Cells Neural Differentiation Qualifies the Role of Wnt/beta-Catenin Signals in Human Telencephalic Specification and Regionalization. *Stem Cells* 31, 1763-1774.

Schlegel, R., Dickson, R.B., Willingham, M.C., and Pastan, I.H. (1982). Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2291-2295.

Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., and Lee, V.M. (2016). Addition of exogenous alpha-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous alpha-synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat Protoc* 9, 2135-2146.

Conclusions et perspectives

I. Conclusions

Durant ma thèse j'ai pu :

1- Mettre en place une méthode fiable d'amplification des assemblages caractérisants les dépôts présents dans des tissus de patients atteints de chacune des synucléinopathies ;

2- Mettre en évidence les agents à utiliser pour décontaminer les matériels de laboratoire souillés par diverses protéines sous forme de fibres amyloïdes ;

3- Participer à une étude portant sur la propagation de différents assemblages d' α -synucléine dans un réseau de neurones corticaux induits.

Mes travaux permettent une avancée dans les méthodes de caractérisation des maladies neurodégénératives, dans les précautions à prendre dans l'étude des assemblages amyloïdes et une meilleure compréhension des synucléinopathies.

A. La PMCA comme outil d'étude des synucléinopathies

De nombreuses équipes cherchent à détecter précocement les dépôts amyloïdes d' α -synucléine, par des méthodes d'amplification, pour en faire des marqueurs prédictifs ou de diagnostic. Certains groupes ont adapté la méthode de la RT-QuIC (" **R**eal-**T**ime **Q**uaking **I**nduced **C**onversion " : conversion induite par agitation en temps réel) pour amplifier les dépôts d' α -synucléine issus de tissus du système nerveux central, ou contenus dans le liquide céphalo-rachidien, de patients. Cette technique est similaire à la PMCA à la différence que les fibres sont fragmentées par l'agitation en présence de petites billes de silice, de zirconium ou de

verre (Atarashi et al., 2011). Ces groupes rapportent avoir réussi à amplifier des agrégats amyloïdes d' α -synucléine présents dans le cerveau, ou dans le liquide céphalo-rachidien, de patients avec une spécificité et une efficacité allant jusqu'à 100 % (Fairfoul et al., 2016; Shahnawaz et al., 2017; Groveman et al., 2018; Sano et al., 2018). Cependant, dans nos mains et dans des conditions identiques à celles décrites, la RT-QuIC n'a jamais permis d'amplifier les assemblages issus de patients, même avec des doses d'amorces augmentées. De plus, pour suivre la cinétique d'amplification, la RT-QuIC se fait en présence de thioflavine T. Or, il a été démontré que, lors de l'amplification des fibres amyloïdes, la thioflavine T peut produire des artéfacts dans la cinétique, et surtout modifier la structure des fibres (Coelho-Cerqueira et al., 2014; Kumar et al., 2017). Puisque notre but est d'amplifier les fibres, présentes dans les dépôts de patients, pour en faire la caractérisation structurale et fonctionnelle par la suite, nous avons préféré ne pas poursuivre l'amplification utilisant la RT-QuIC.

D'autres équipes ont cherché à amplifier les dépôts d' α -synucléine en faisant une combinaison PMCA-RT-QuIC (Herva et al., 2014; Becker et al., 2018). En effet, dans ces études, la PMCA est très proche de celle décrite à l'origine. Toutefois, des billes sont ajoutées aux tubes à la manière de la RT-QuIC. Nous ne nous sommes pas intéressés à ces protocoles car les résultats publiés montraient soit une polymérisation *de novo* très rapide, soit une reproductibilité peu satisfaisante.

Jusqu'à présent, très peu de travaux évoquent l'utilisation de la PMCA pour l'amplification d'assemblages d' α -synucléine. Il est à noter que Roostaei *et al* ont décrit la PMCA pour l'amplification de fibres recombinantes d' α -synucléine (Roostaei et al., 2013). Cependant, dans ce protocole, il est nécessaire d'avoir de l'agitation en

plus de la sonication, sinon aucune amplification n'est détectée. Jung *et al*, quant à eux, ont mis en avant l'amplification des assemblages issus de cerveaux de souris par PMCA en présence de Triton X-100 (un détergent doux) (Jung et al., 2017). Ce résultat peut paraître surprenant car, dans nos mains, la présence de détergent, même en très faible quantité, facilite la polymérisation *de novo*. Comme nous cherchons à réaliser une amplification spécifique des dépôts d' α -synucléine, nous n'avons pas poursuivi l'amplification en présence de détergent.

Durant ma thèse, j'ai adapté la technique de la PMCA pour l'amplification de fibres amyloïdes d' α -synucléine. Tout d'abord, j'ai pu mettre en avant que, dans un contexte où des fibres préformées sont amplifiées, notre protocole de PMCA permet d'amplifier jusqu'à 10 pM d' α -synucléine recombinante fibrillaire, sans qu'aucune polymérisation *de novo* de l' α -synucléine ne survienne. Par la suite, j'ai pu amplifier les assemblages présents dans les dépôts provenant de cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson, de démences à corps de Lewy ou d'atrophie multi-systématisée. De même, nous avons testé la technique d'amplification sur des tissus périphériques de patients atteints de la maladie de Parkinson. Au final, la technique de PMCA, que j'ai mis en place, s'est avérée être très spécifique car, quelque soit la région ou la pathologie à analyser, nous avons pu détecter de l'amplification, sans qu'il y ait de la polymérisation *de novo* avec les tissus contrôles.

Grâce à cette technique et à des analyses histologiques, nous avons pu analyser différentes régions du système digestif de patients atteints de la maladie de Parkinson. Cette étude a permis de mettre en avant que les régions où il est le plus judicieux de faire une biopsie, dans le cadre d'un diagnostic ou de recherches, sont l'antrum et le côlon sigmoïde. Nous avons pu montrer que le rectum est une région à

éviter puisqu'aucune inclusion n'est détectable en histologie, et qu'aucune amplification spécifique n'a été observée par PMCA. Il est toutefois nécessaire de préciser que, pour certains patients atteints de la maladie de Parkinson, aucun dépôt n'a pu être observé que ce soit par histologie ou par amplification. Ces résultats rejoignent d'autres études qui rapportent que, dans la maladie de Parkinson, la présence de dépôts dans le système nerveux entérique n'est pas très abondante ou systématique, et forme un gradient rostro-caudal le long du tractus digestif (Beach et al., 2010; Annerino et al., 2012; Pouclet et al., 2012).

B. Procédures de décontamination des fibres amyloïdes

Jusqu'à présent, il n'a jamais été démontré que les assemblages amyloïdes d' α -synucléine, de Tau ou d'A β ont la capacité de contaminer quelqu'un par voie alimentaire ou orale, ou par coupure contrairement au prion PrP. Concernant la contamination par voie iatrogène, celle-ci a été démontrée pour A β dans le cadre d'une greffe ou d'utilisation d'hormones de croissance (Duyckaerts et al., 2018; Hervé et al., 2018; Jaunmuktane et al., 2018), et est suggérée pour Tau dans le cadre d'utilisation d'hormones de croissance (Duyckaerts et al., 2018). Dans une idée de prévention, nous avons testé l'efficacité de différents agents à détacher et désassembler différentes fibres amyloïdes.

Mon projet fait suite à une précédente publication ayant eu le même objectif pour deux souches d' α -synucléine (Bousset et al., 2016). Cette première étude avait permis de mettre en avant que le SDS et l'Hellmanex sont de bons agents pour détacher, et désassembler, les souches de " fibres " et de " rubans " d' α -synucléine. De même, il avait été démontré que l'eau de Javel, comme la soude, permettent de détacher, mais pas de désassembler, les fibres amyloïdes d' α -synucléine. Dans ces

travaux, j'ai testé des procédures de nettoyage sur ces deux mêmes souches ainsi que deux autres souches d' α -synucléine récemment décrites au laboratoire, sur deux isoformes de Tau et sur des fibres du peptide A β . Pour cela, j'ai testé les agents décrits lors de la précédente publication, à l'exception de l'eau de Javel qui fut compliquée à utiliser dans un système de détection de fluorescence, et ayant déjà été démontrée comme peu efficace pour le désassemblage. La guanidine, une molécule dénaturant les protéines, fut rajoutée aux solvants testés. Au final, j'ai mis en évidence que le SDS, l'Hellmanex et le TFD4 sont les meilleurs agents pour décontaminer des surfaces et désassembler des fibres amyloïdes. Il est aussi intéressant de remarquer que chaque fibre amyloïde, selon la protéine qui la compose voire sa structure, possède des caractéristiques bien précises de résistance ou de sensibilité aux agents testés. Toutes les données ont été compilées dans une unique représentation, un tableau permettant de connaître le meilleur agent à utiliser selon la surface à décontaminer et l'assemblage à inactiver. Ainsi, en adoptant les recommandations données dans notre publication, il sera possible de réduire les risques potentiels de contamination accidentelle.

C. Propagation d'assemblages d' α -synucléine dans un réseau de neurones

Ce projet est l'une des premières études à analyser la propagation de l' α -synucléine dans un contexte s'approchant au plus du cerveau humain, grâce à l'utilisation d'un réseau de neurones humains issus de cellules souches. En effet, jusqu'à présent, toutes les études ont été réalisées soit *in vivo* chez l'animal (souris, rats, singes), soit dans des cultures cellulaires (lignées cellulaires ou cultures primaires de rat ou de souris). Dans cette étude, des cellules souches humaines ont

été reprogrammées pour devenir des neurones, permettant ainsi d'étudier l'agrégation de l' α -synucléine humaine au contact du protéome humain, et non celui d'une autre espèce. L'analyse des marqueurs cellulaires exprimés a montré que le réseau créé simulait des connexions cortico-corticales humaines. Finalement, il a été démontré que les " fibres " d' α -synucléine, comme les " rubans ", peuvent entrer dans les neurones par endocytose, s'y multiplier, faire des dépôts, perturber le fonctionnement du neurone, et se propager de neurone en neurone en empruntant un transport actif le long de l'axone. De plus, lors de ces tests, les " rubans " ont montré une meilleure capacité de propagation que les " fibres ".

II. Perspectives

Les travaux initiés durant ma thèse seront à la base de nombreuses études. En effet, la technique de PMCA, mise au point pour amplifier les assemblages présents dans les dépôts provenant de patients atteints de synucléinopathies, permet d'entreprendre de nouvelles recherches sur les assemblages amplifiés et de s'affranchir des purifications à partir de tissus nerveux.

A. Caractérisation structurale des dépôts amplifiés

Notre hypothèse de travail étant qu'à chaque synucléinopathie correspond une souche d' α -synucléine, la première perspective sera de caractériser structurellement les assemblages amplifiés issus de chacune des synucléinopathies. Ainsi, il pourra être confirmé, pour la première fois, l'existence de souches structurales propres à la maladie de Parkinson, aux démences à corps de Lewy et à l'atrophie multi-systématisée. Les différentes approches qui pourront être utilisées pour déterminer la structure de l' α -synucléine dans les assemblages sont :

1. La protéolyse ménagée

La protéolyse ménagée est une méthode simple et efficace pour le typage des maladies à prion. En effet, l'accessibilité de la chaîne polypeptidique d'une protéine repliée, à une protéase, fournit un profil de digestion spécifique du repliement de celle-ci, permettant une analyse rapide de la structure. La protéolyse ménagée des différentes souches pourra être réalisée avec la protéinase K (la plus couramment utilisée), mais aussi avec d'autres protéases plus spécifiques telles que la GluC ou la trypsine. De cette manière, les assemblages issus des différentes synucléinopathies pourraient donner des profils protéolytiques spécifiques. Cependant, il est à préciser que, même si le résultat entre deux souches est identique, cela n'indiquera pas nécessairement des conformations identiques. Effectivement, il est possible que différentes structures donnent des profils de protéolyses ménagées similaires, étant donné que deux peptides distincts peuvent migrer au même niveau sur un gel d'électrophorèse.

2. La microscopie électronique

La structure et l'empilement des monomères dans les agrégats peuvent influencer sur la morphologie des fibres amyloïdes. Ainsi, la microscopie électronique à transmission permet, en plus de contrôler l'aspect amyloïde des fibres amplifiées par PMCA, de visualiser la morphologie générale de celles-ci. De plus, la structure atomique des assemblages peut être entreprise par cryo-microscopie électronique. En effet, cette technique permet d'accéder rapidement à la structure de chacun des acides aminés qui constituent le squelette des fibres amyloïdes (Dearborn et al., 2016; Guerrero-Ferreira et al., 2018; Li et al., 2018a, 2018b). Cette méthode nécessite d'avoir une population homogène d'objets, ce qui devrait être le cas pour

les produits d'amplification.

3. La spectrométrie de masse

En l'absence de données structurales au niveau atomique, la spectrométrie de masse peut être utilisée pour affiner les données de protéolyse ménagée. Tout d'abord, cela permettra d'identifier les peptides présents dans le profil protéolytique de chaque souche, et donc les sites de clivages accessibles. Ainsi, il sera possible de discriminer, pour deux profils similaires en électrophorèse, s'ils sont différents au niveau des fragments générés ou non. D'autre part, il sera possible d'utiliser des agents pontants pour identifier les régions exposées des fibres, ainsi que les interactions intramoléculaires de l' α -synucléine. Ces résultats donneront donc des informations structurales sur le repliement de l' α -synucléine dans les agrégats.

4. La résonance magnétique nucléaire à l'état solide

Cette technique est sûrement la plus précise pour la caractérisation de la structure des assemblages. Effectivement, la résonance magnétique nucléaire à l'état solide fournit une empreinte de repliement, correspondant à la proximité entre les différents atomes d'une molécule. Après analyse des résultats, la structure secondaire des différentes régions des protéines, composant la fibre amyloïde, pourra être déterminée. L'intérêt est que, contrairement aux agrégats *ex vivo*, les dépôts amplifiés par PMCA seront analysables, par résonance magnétique nucléaire à l'état solide, en utilisant de l' α -synucléine marquée au ^{13}C ou ^{14}N . Ainsi, comme il a été démontré pour les " fibres " et les " rubans " d' α -synucléine (Gath et al., 2014), il sera possible de mettre en avant des différences de structure secondaire, ainsi que les zones libres pouvant permettre des interactions avec des partenaires cellulaires.

B. Caractérisation fonctionnelle des dépôts amplifiés

L'analyse des propriétés biologiques de chacun des assemblages d' α -synucléine permettra de mettre en avant des différences fonctionnelles entre les souches. De plus, les résultats ainsi obtenus permettront de mieux comprendre les différences observées entre chaque synucléinopathie (progression, sévérité, ...). Plusieurs approches seront envisagées :

1. Mesurer les propriétés de propagation des souches

Premièrement, il faudra faire l'analyse de la capacité des différents assemblages à se lier et à pénétrer dans des cellules en culture. Ces tests donneront ainsi une idée de la capacité des souches à être internalisées. Deuxièmement, il sera intéressant de faire l'analyse du comportement des fibres dans des neurones cultivés dans des chambres de culture microfluidique. En effet, comme nous avons pu le voir dans le manuscrit, cette approche permet de mettre en avant les capacités de prise en charge, de transport et de relargage des assemblages par les neurones. Ainsi, en réalisant ces mesures dans plusieurs types cellulaires caractéristiques de différentes régions du cerveau (striatum, cortex, cervelet, ...), il sera possible de mettre en évidence un profil de propagation préférentiel des souches.

2. Tester la pathogénicité

Tout d'abord, il sera intéressant de mesurer les propriétés qu'ont les souches à recruter de la protéine endogène et à persister *in cellulo*. Ces tests permettront de conclure sur la capacité des souches, dans une cellule, à s'allonger et s'amplifier tout en résistant aux systèmes de dégradation. Enfin, il sera important de réinjecter les fibres amplifiées à des animaux. D'une part, pour contrôler que la propagation de

chaque souche est possible chez l'animal, et d'autre part, pour analyser leurs toxicités relatives *in vivo*. Ainsi, ces résultats permettront de démontrer, ou non, si le développement typique d'une synucléinopathie peut être résumé à la seule structure de l' α -synucléine agrégée.

3. Identification des partenaires des fibres issues d'amplification

Des analyses protéomiques d'interaction ont déjà été menées à partir de fibres recombinantes. Ainsi, il serait intéressant d'identifier si les interactions entre les fibres amplifiées et les protéines membranaires ou cytoplasmiques sont les mêmes. Par exemple, il pourra être mis en évidence si une souche a plus d'affinité pour un récepteur membranaire que les autres. Ce test est intéressant car il pourrait expliquer les différences de propagation et de pénétrance observées pour les différentes souches.

C. Vers une généralisation de la caractérisation des synucléinopathies par PMCA

Les premiers résultats de l'analyse de biopsies gastriques nous indiquent que la PMCA pourrait être une méthode de diagnostic. Il serait donc intéressant de caractériser la structure et les propriétés des assemblages présents dans ces régions périphériques, et de les comparer à celles du système nerveux central. Les résultats de ces caractérisations pourraient confirmer qu'une synucléinopathie correspond bien à une seule structure de fibre, ou que les dépôts périphériques sont différents. De plus, les tissus périphériques étant accessibles par simple biopsie, il sera possible de faire des études longitudinales sur des patients vivants.

Deuxièmement, il serait intéressant d'étudier les formes familiales de maladie

parkinsonienne. En effet, comme nous avons pu le voir, certaines formes familiales ont été rapportées comme étant plus proches d'une synucléinopathie que d'une autre. Il serait donc possible de savoir, dans le cadre d'une mutation, duplication ou triplication de l' α -synucléine, ou d'une mutation dans une autre protéine, quelle structure adopte l' α -synucléine agrégée. Ainsi, en comparant ces résultats avec ceux qui auront été obtenus pour les formes sporadiques des synucléinopathies, il pourrait être possible de faire un lien entre forme sporadique, forme familiale et agrégats d' α -synucléine.

D. Utilisation des agrégats amplifiés pour la recherche translationnelle

Aujourd'hui, aucun médicament n'existe pour soigner les synucléinopathies. En effet, les seuls traitements existants sont pour traiter les symptômes moteurs : prise de molécules proches de la dopamine (par voie orale, perfusion duodénale ou pompe), greffe de neurones ou encore stimulation cérébrale profonde (Eger et al., 2009). Il est nécessaire de trouver des médicaments soignant ces maladies afin de se passer de ces traitements qui présentent des inconvénients. Par exemple, les molécules proches de la dopamine permettent de traiter les symptômes moteurs parkinsoniens (pas dans toutes les maladies comme nous l'avons vu), mais ils n'ont d'effet ni sur les troubles intellectuels, ni sur la progression de la maladie. De plus, après une certaine période, les patients développent des dyskinésies obligeant à arrêter le traitement.

L'explication d'une aussi faible avancée pharmacologique vient peut-être des méthodes de la recherche. Effectivement, comme nous avons pu le voir, les recherches fondamentales et translationnelles utilisent soit des fibres amyloïdes

totale­ment recombinantes, soit des inclusions qui ont été extraites de cerveaux de patients. Or, les fibres recombinantes ont l'inconvénient de ne pas avoir nécessairement les mêmes structures et propriétés que ce qui est retrouvé chez les patients. Concernant les inclusions purifiées, il faut garder à l'esprit que ces dépôts sont composés de nombreuses protéines. Donc, *in vivo*, il pourrait y avoir des effets de pléiotropies liés aux différentes protéines présentes dans l'inclusion. Pour ces raisons, il serait intéressant de travailler à partir des agrégats amplifiés provenant des diverses maladies. En effet, après plusieurs cycles d'amplification, ces assemblages auront l'avantage d'être purs, tout en conservant la structure initiale du patient. Ainsi, il sera possible de tester les fibres amplifiées pour trouver des marqueurs spécifiques de chaque souche pour l'imagerie médicale. Autrement, il sera possible de tester l'efficacité de l'inhibition de la propagation des fibres amplifiées, par différents composés prometteurs (par exemple : des chaperons moléculaires (Pemberton, 2011), des flavonoïdes (Hong et al., 2008) ou encore des anticorps). Ces tests pourraient se faire : en culture cellulaire de neurones humains croissants dans un système de microfluidique (comme vu dans ce manuscrit) ; dans des organoïdes de mini-cerveaux (culture cellulaire tridimensionnelle qui simule un cerveau par l'hétérogénéité des cellules et les connexions qui le composent (Lancaster et al., 2013)) ; ou chez l'animal, en développant des modèles de synucléinopathies induites par les différentes souches d' α -synucléine amplifiées par PMCA.

La recherche clinique doit tester ses médicaments sur des cohortes de patients dont les symptômes et la maladie sont clairement définis. Or, comme nous l'avons vu, lorsque les symptômes caractéristiques de la maladie sont présents, cela signifie, au niveau cellulaire, que la maladie est déjà à un stade avancé. Cela peut

expliquer pourquoi de nombreux médicaments, testés en phase clinique, n'ont pas abouti à leurs mises sur le marché. Prenons l'exemple d'un médicament supposé ralentir la progression de la maladie de Parkinson, en favorisant la survie des neurones dopaminergiques, et testé sur des patients diagnostiqués. Les résultats seront très probablement décevants puisque, quand les symptômes moteurs surviennent, 50 à 60 % des neurones dopaminergiques sont morts. Il serait donc bien plus intéressant de travailler à des stades précoces de la maladie, par exemple en phase prodromique. Ceci pourrait se faire, par exemple, par l'analyse de cohortes de patients, pour une étude clinique, qui seraient testés via la présence, dans les biopsies, de marqueurs identifiés par PMCA. L'avantage est que, comme les patients seraient en train de développer la maladie, il sera possible de voir la capacité d'un médicament à ralentir, voir stopper, cette progression.

E. Vers une méthode de diagnostic ?

La PMCA pourrait devenir une méthode de diagnostic si la sensibilité et la spécificité de la technique étaient augmentées. Ainsi, il serait possible de faire un diagnostic précoce et discriminant la synucléinopathie pour chaque patient. Ce test pourrait se baser sur l'utilisation de plasma, ou de liquide céphalo-rachidien, qui sont supposés contenir des formes agrégées d' α -synucléine (El-Agnaf et al., 2006). Il serait aussi possible d'utiliser des biopsies caractérisées comme pouvant contenir des agrégats d' α -synucléine précocement, telles que des biopsies de la glande submandibulaire (Shin et al., 2018) ou des biopsies gastriques (comme vu dans ce manuscrit).

Bibliographie

- Alper, T., Haig, D.A., and Clarke, M.C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 278–284.
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., and Clarke, M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764–766.
- Anderson, J.P., Walker, D.E., Goldstein, J.M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R.J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., et al. (2006). Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J. Biol. Chem.* 281, 29739–29752.
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 223–230.
- Angot, E., Steiner, J.A., Lema Tomé, C.M., Ekström, P., Mattsson, B., Björklund, A., and Brundin, P. (2012). Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *PLoS ONE* 7, e39465.
- Annerino, D.M., Arshad, S., Taylor, G.M., Adler, C.H., Beach, T.G., and Greene, J.G. (2012). Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol.* 124, 665–680.
- Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., et al. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 28, 811–813.
- Arai, T., Uéda, K., Ikeda, K., Akiyama, H., Haga, C., Kondo, H., Kuroki, N., Niizato, K., Iritani, S., and Tsuchiya, K. (1999). Argyrophilic glial inclusions in the midbrain of patients with Parkinson's disease and diffuse Lewy body disease are immunopositive for NACP/alpha-synuclein. *Neurosci. Lett.* 259, 83–86.
- Araki, K., Yagi, N., Ikemoto, Y., Yagi, H., Choong, C.-J., Hayakawa, H., Beck, G., Sumi, H., Fujimura, H., Moriwaki, T., et al. (2015). Synchrotron FTIR microspectroscopy for structural analysis of Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients. *Sci Rep* 5, 17625.
- Ascherio, A., and Schwarzschild, M.A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol* 15, 1257–1272.
- Atarashi, R., Satoh, K., Sano, K., Fuse, T., Yamaguchi, N., Ishibashi, D., Matsubara, T., Nakagaki, T., Yamanaka, H., Shirabe, S., et al. (2011). Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat. Med.* 17, 175–178.
- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P.H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* 152, 879–884.
- Barrett, P.J., and Timothy Greenamyre, J. (2015). Post-translational modification of α -synuclein in Parkinson's disease. *Brain Res.* 1628, 247–253.
- Barria, M.A., Mukherjee, A., Gonzalez-Romero, D., Morales, R., and Soto, C. (2009). De novo generation of infectious prions in vitro produces a new disease phenotype. *PLoS Pathog.* 5, e1000421.
- Bartels, T., Choi, J.G., and Selkoe, D.J. (2011). α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477, 107–110.
- Beach, T.G., Adler, C.H., Lue, L., Sue, L.I., Bachalakuri, J., Henry-Watson, J., Sasse, J., Boyer, S., Shirohi, S., Brooks, R., et al. (2009). Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathol.* 117, 613–634.
- Beach, T.G., Adler, C.H., Sue, L.I., Vedders, L., Lue, L., White Iii, C.L., Akiyama, H.,

- Caviness, J.N., Shill, H.A., Sabbagh, M.N., et al. (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 119, 689–702.
- Beck, E., Daniel, P.M., Matthews, W.B., Stevens, D.L., Alpers, M.P., Asher, D.M., Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J. (1969). Creutzfeldt-Jakob disease. The neuropathology of a transmission experiment. *Brain* 92, 699–716.
- Becker, K., Wang, X., Vander Stel, K., Chu, Y., Kordower, J., and Ma, J. (2018). Detecting Alpha Synuclein Seeding Activity in Formaldehyde-Fixed MSA Patient Tissue by PMCA. *Mol. Neurobiol.* 55, 8728–8737.
- Beijerinck, M.W. (1898). Ueber ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. (Concerning a contagium vivum fluidum as a cause of the spot-disease of tobacco leaves. Traduit par J. Johnson. 1942. *Phytopathological classics. Amer. Phytopathol. Soc., no. 7.*) *Verhandelingen Der Koninklijke Akademie Wetenschappen Te Amsterdam* 3–21.
- Benarroch, E.E., Schmeichel, A.M., Low, P.A., Boeve, B.F., Sandroni, P., and Parisi, J.E. (2005). Involvement of medullary regions controlling sympathetic output in Lewy body disease. *Brain* 128, 338–344.
- Benarroch, E.E., Schmeichel, A.M., Sandroni, P., Low, P.A., and Parisi, J.E. (2006). Involvement of vagal autonomic nuclei in multiple system atrophy and Lewy body disease. *Neurology* 66, 378–383.
- Bernis, M.E., Babila, J.T., Breid, S., Wüsten, K.A., Wüllner, U., and Tamgüney, G. (2015). Prion-like propagation of human brain-derived alpha-synuclein in transgenic mice expressing human wild-type alpha-synuclein. *Acta Neuropathol Commun* 3, 75.
- Bessen, R.A., and Marsh, R.F. (1992). Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 2), 329–334.
- Bessen, R.A., and Marsh, R.F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* 68, 7859–7868.
- Bessen, R.A., Kocisko, D.A., Raymond, G.J., Nandan, S., Lansbury, P.T., and Caughey, B. (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 375, 698–700.
- Bétemps, D., Verchère, J., Brot, S., Morignat, E., Bousset, L., Gaillard, D., Lakhdar, L., Melki, R., and Baron, T. (2014). Alpha-synuclein spreading in M83 mice brain revealed by detection of pathological α -synuclein by enhanced ELISA. *Acta Neuropathol Commun* 2, 29.
- Birkmayer, W., and Hornykiewicz, O. (1998). The effect of l-3,4-dihydroxyphenylalanine (=DOPA) on akinesia in parkinsonism. *Parkinsonism Relat. Disord.* 4, 59–60.
- Bolton, D.C., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309–1311.
- Bonnet, A.M., Jutras, M.F., Czernecki, V., Corvol, J.C., and Vidailhet, M. (2012). Nonmotor symptoms in Parkinson's disease in 2012: relevant clinical aspects. *Parkinsons Dis* 2012, 198316.
- Borchelt, D.R., Taraboulos, A., and Prusiner, S.B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 16188–16199.
- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Böckmann, A., Meier, B.H., et al. (2013). Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* 4, 2575.

- Bousset, L., Brundin, P., Böckmann, A., Meier, B., and Melki, R. (2016). An Efficient Procedure for Removal and Inactivation of Alpha-Synuclein Assemblies from Laboratory Materials. *J Parkinsons Dis* 6, 143–151.
- Bower, J.H., Maraganore, D.M., McDonnell, S.K., and Rocca, W.A. (1997). Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology* 49, 1284–1288.
- Bozluolcay, M., Elmali, A.D., Menku, S.F., Zeydan, B., Benbir, G., Delil, S., and Yeni, N. (2014). Magnetic resonance imaging findings in probable Creutzfeld-Jacob disease: comparison with electroencephalography and cerebrospinal fluid characteristics. *Acta Radiol Short Rep* 3.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2008). Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70, 1916–1925.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2009). Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 201, 1–119.
- Braak, H., Rüb, U., Gai, W.P., and Del Tredici, K. (2003a). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm (Vienna)* 110, 517–536.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., and Braak, E. (2003b). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.
- Braak, H., de Vos, R.A.I., Bohl, J., and 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., Sastre, M., and Del Tredici, K. (2007). Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 114, 231–241.
- Brahic, M., Bousset, L., Bieri, G., Melki, R., and Gitler, A.D. (2016). Axonal transport and secretion of fibrillar forms of α -synuclein, A β 42 peptide and HTTExon 1. *Acta Neuropathol.* 131, 539–548.
- Braun, A.R., Sevcsik, E., Chin, P., Rhoades, E., Tristram-Nagle, S., and Sachs, J.N. (2012). α -Synuclein induces both positive mean curvature and negative Gaussian curvature in membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2613–2620.
- Braun, A.R., Lacy, M.M., Ducas, V.C., Rhoades, E., and Sachs, J.N. (2014). α -Synuclein-induced membrane remodeling is driven by binding affinity, partition depth, and interleaflet order asymmetry. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 9962–9972.
- Brettschneider, J., Irwin, D.J., Boluda, S., Byrne, M.D., Fang, L., Lee, E.B., Robinson, J.L., Suh, E., Van Deerlin, V.M., Toledo, J.B., et al. (2017). Progression of alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy of the cerebellar type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 43, 315–329.
- Brown, R.G., Lacomblez, L., Landwehrmeyer, B.G., Bak, T., Uttner, I., Dubois, B., Agid, Y., Ludolph, A., Bensimon, G., Payan, C., et al. (2010). Cognitive impairment in patients with multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *Brain* 133, 2382–2393.
- Bruce, M.E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br. Med. Bull.* 49, 822–838.
- Bruce, M.E., McBride, P.A., and Farquhar, C.F. (1989). Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci. Lett.* 102, 1–6.
- Bruce, M.E., McConnell, I., Fraser, H., and Dickinson, A.G. (1991). The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J. Gen.*

- Virol.* 72 (Pt 3), 595–603.
- Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., et al. (1997). Transmissions to mice indicate that “new variant” CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 498–501.
- Brundin, P., and Melki, R. (2017). Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson’s Disease. *J. Neurosci.* 37, 9808–9818.
- Brundin, P., Melki, R., and Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 301–307.
- Bryan, C.P. (1930). *Ancient Egyptian medicine: The Papyrus Ebers* (translated from the German Version).
- Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339–1347.
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., and Südhof, T.C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329, 1663–1667.
- Burré, J., Sharma, M., and Südhof, T.C. (2014). α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E4274-4283.
- Carlson, G.A., Westaway, D., DeArmond, S.J., Peterson-Torchia, M., and Prusiner, S.B. (1989). Primary structure of prion protein may modify scrapie isolate properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7475–7479.
- Caughey, B., and Lansbury, P.T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 267–298.
- Caughey, B., and Raymond, G.J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* 266, 18217–18223.
- Chandler, R.L., and Turfrey, B.A. (1972). Inoculation of voles, Chinese hamsters, gerbils and guinea-pigs with scrapie brain material. *Res. Vet. Sci.* 13, 219–224.
- Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., and Südhof, T.C. (2003). A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 278, 15313–15318.
- Chang, H.-C., Tang, Y.-C., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2007). SnapShot: molecular chaperones, Part I. *Cell* 128, 212.
- Charcot, J.-M. (1872). De la paralysie agitante. *Oeuvres Complètes, Leçons Sur Les Maladies Du Système Nerveux* 1, 155–188.
- Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., et al. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson’s disease. *Lancet* 364, 1167–1169.
- Chen, S.W., Drakulic, S., Deas, E., Ouberai, M., Aprile, F.A., Arranz, R., Ness, S., Roodveldt, C., Guilliams, T., De-Genst, E.J., et al. (2015). Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α -synuclein fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E1994-2003.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., and Keith, J.M. (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315, 331–333.
- Chiò, A., Magnani, C., and Schiffer, D. (1998). Prevalence of Parkinson’s disease in Northwestern Italy: comparison of tracer methodology and clinical ascertainment

- of cases. *Mov. Disord.* 13, 400–405.
- Choi, W., Zibae, S., Jakes, R., Serpell, L.C., Davletov, B., Crowther, R.A., and Goedert, M. (2004). Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human alpha-synuclein. *FEBS Lett.* 576, 363–368.
- Chrysostome, V., Tison, F., Yekhlief, F., Sourgen, C., Baldi, I., and Dartigues, J.F. (2004). Epidemiology of multiple system atrophy: a prevalence and pilot risk factor study in Aquitaine, France. *Neuroepidemiology* 23, 201–208.
- Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* 21, 249–254.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1977). Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* 116, 227–247.
- Cobb, N.J., and Surewicz, W.K. (2009). Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry* 48, 2574–2585.
- Cochemé, H.M., and Murphy, M.P. (2008). Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J. Biol. Chem.* 283, 1786–1798.
- Coelho-Cerqueira, E., Pinheiro, A.S., and Follmer, C. (2014). Pitfalls associated with the use of Thioflavin-T to monitor anti-fibrillogenic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 3194–3198.
- Colby, D.W., and Prusiner, S.B. (2011). Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a006833.
- Colby, D.W., Giles, K., Legname, G., Wille, H., Baskakov, I.V., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2009). Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 20417–20422.
- Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of “new variant” CJD. *Nature* 383, 685–690.
- Corti, O., Lesage, S., and Brice, A. (2011). What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson’s disease. *Physiol. Rev.* 91, 1161–1218.
- Cox, D., Carver, J.A., and Ecroyd, H. (2014). Preventing α -synuclein aggregation: the role of the small heat-shock molecular chaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1830–1843.
- Cremades, N., Cohen, S.I.A., Deas, E., Abramov, A.Y., Chen, A.Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R.W., Dunne, P., Aprile, F.A., et al. (2012). Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell* 149, 1048–1059.
- Creutzfeldt, H.G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Gesamte Neurol Psy* 1–18.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561–563.
- Cuillé, J., and Chelle, P. (1936). La maladie dite “tremblante” du mouton; est-elle inoculable? *Compte Rend Acad Sci* 203:1552.
- Cuillé, J., and Chelle, P. (1938). Investigations of scrapie in sheep. *Vet Med* 417–418.
- Cushman, M., Johnson, B.S., King, O.D., Gitler, A.D., and Shorter, J. (2010). Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. *J. Cell. Sci.* 123, 1191–1201.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., and Kostka, M. (2007). Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci.* 27, 9220–9232.
- Dave, K.D., De Silva, S., Sheth, N.P., Ramboz, S., Beck, M.J., Quang, C., Switzer,

- R.C., Ahmad, S.O., Sunkin, S.M., Walker, D., et al. (2014). Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 70, 190–203.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* 273, 9443–9449.
- Dearborn, A.D., Wall, J.S., Cheng, N., Heymann, J.B., Kajava, A.V., Varkey, J., Langen, R., and Steven, A.C. (2016). α -Synuclein Amyloid Fibrils with Two Entwined, Asymmetrically Associated Protofibrils. *J. Biol. Chem.* 291, 2310–2318.
- DeArmond, S.J., McKinley, M.P., Barry, R.A., Braunfeld, M.B., McColloch, J.R., and Prusiner, S.B. (1985). Identification of prion amyloid filaments in scrapie-infected brain. *Cell* 41, 221–235.
- DeBurman, S.K., Raymond, G.J., Caughey, B., and Lindquist, S. (1997). Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13938–13943.
- Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., Singleton, A., Olanow, C.W., Merchant, K.M., Bezdard, E., et al. (2015). Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol* 14, 855–866.
- Deleault, N.R., Geoghegan, J.C., Nishina, K., Kascsak, R., Williamson, R.A., and Supattapone, S. (2005). Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J. Biol. Chem.* 280, 26873–26879.
- Desplats, P., Lee, H.-J., Bae, E.-J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., and Lee, S.-J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13010–13015.
- Dettmer, U., Newman, A.J., Luth, E.S., Bartels, T., and Selkoe, D. (2013). In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of α -synuclein and β -synuclein in neurons and non-neural cells. *J. Biol. Chem.* 288, 6371–6385.
- Diao, J., Burré, J., Vivona, S., Cipriano, D.J., Sharma, M., Kyoung, M., Südhof, T.C., and Brunger, A.T. (2013). Native α -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *Elife* 2, e00592.
- Dickinson, A.G., and Fraser, H. (1977). Scrapie: Pathogenesis in Inbred Mice: An Assessment of Host Control and Response Involving Many Strains of Agent. In *Slow Virus Infections of the Central Nervous System*, V. ter Meulen, and M. Katz, eds. (Springer New York), pp. 3–14.
- Dickinson, A.G., and Meikle, V.M. (1969). A comparison of some biological characteristics of the mouse-passaged scrapie agents, 22A and ME7. *Genet. Res.* 13, 213–225.
- Dickson, D.W. (2012). Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- Dickson, D.W., Braak, H., Duda, J.E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G.M., Hardy, J., Leverenz, J.B., Del Tredici, K., Wszolek, Z.K., et al. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 8, 1150–1157.
- Dobson, C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884–890.
- Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., et al. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations,

- 2005 through 2030. *Neurology* 68, 384–386.
- Duffy, P.E., and Tennyson, V.M. (1965). Phase and Electron Microscopic Observations of Lewy Bodies and Melanin Granules in the Substantia Nigra and Locus Caeruleus in Parkinson's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 24, 398–414.
- Duyckaerts, C. (2000). [Lewy bodies]. *Rev. Neurol. (Paris)* 156, 800–801.
- Duyckaerts, C., Seilhean, D., Sazdovitch, V., Plu, I., Delatour, B., and Potier, M.-C. (2015). Seeding and propagation of lesions in neurodegenerative diseases: a new paradigm. *Bull. Acad. Natl. Med.* 199, 809–819.
- Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Ando, K., Seilhean, D., Privat, N., Yilmaz, Z., Peckeu, L., Amar, E., Comoy, E., Maceski, A., et al. (2018). Neuropathology of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease and immunoassay of French cadaver-sourced growth hormone batches suggest possible transmission of tauopathy and long incubation periods for the transmission of Abeta pathology. *Acta Neuropathol.* 135, 201–212.
- Eger, A.-F., Gaudet-Blavignac, C., and Hammer, A. (2009). La maladie de Parkinson (Université de Genève).
- Ehringer, H., and Hornykiewicz, O. (1960). [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin. Wochenschr.* 38, 1236–1239.
- El-Agnaf, O.M.A., Salem, S.A., Paleologou, K.E., Curran, M.D., Gibson, M.J., Court, J.A., Schlossmacher, M.G., and Allsop, D. (2006). Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.* 20, 419–425.
- Elbaz, A., Bower, J.H., Maraganore, D.M., McDonnell, S.K., Peterson, B.J., Ahlskog, J.E., Schaid, D.J., and Rocca, W.A. (2002). Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol* 55, 25–31.
- Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S., and Moisan, F. (2016). Epidemiology of Parkinson's disease. *Rev. Neurol. (Paris)* 172, 14–26.
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., and Browne, G. (2001). Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* 307, 1061–1073.
- Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328, 378–379.
- Fairfoul, G., McGuire, L.I., Pal, S., Ironside, J.W., Neumann, J., Christie, S., Joachim, C., Esiri, M., Evetts, S.G., Rolinski, M., et al. (2016). Alpha-synuclein RT-QuIC in the CSF of patients with alpha-synucleinopathies. *Ann Clin Transl Neurol* 3, 812–818.
- Fares, M.-B., Ait-Bouziad, N., Dikiy, I., Mbefo, M.K., Jovičić, A., Kiely, A., Holton, J.L., Lee, S.-J., Gitler, A.D., Eliezer, D., et al. (2014). The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of α -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4491–4509.
- Fares, M.-B., Maco, B., Oueslati, A., Rockenstein, E., Ninkina, N., Buchman, V.L., Masliah, E., and Lashuel, H.A. (2016). Induction of de novo α -synuclein fibrillization in a neuronal model for Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E912-921.
- Fernandez, H.H. (2015). 2015 Update on Parkinson disease. *Cleve Clin J Med* 82, 563–568.
- Fersht, A. (1999). Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding. Protein Science.
- Flagmeier, P., Meisl, G., Vendruscolo, M., Knowles, T.P.J., Dobson, C.M., Buell, A.K., and Galvagnion, C. (2016). Mutations associated with familial Parkinson's disease

- alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 10328–10333.
- Forman, M.S., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2004). Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.* 10, 1055–1063.
- Forno, L.S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 259–272.
- Fraser, H. (1976). The pathology of a natural and experimental scrapie. *Front Biol* 44, 267–305.
- Fraser, H., and Dickinson, A.G. (1973). Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J. Comp. Pathol.* 83, 29–40.
- Freundt, E.C., Maynard, N., Clancy, E.K., Roy, S., Bousset, L., Sourigues, Y., Covert, M., Melki, R., Kirkegaard, K., and Brahic, M. (2012). Neuron-to-neuron transmission of α -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann. Neurol.* 72, 517–524.
- Frost, B., and Diamond, M.I. (2010). Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 155–159.
- Fujishiro, H., Ahn, T.-B., Frigerio, R., DelleDonne, A., Josephs, K.A., Parisi, J.E., Eric Ahlskog, J., and Dickson, D.W. (2008). Glial cytoplasmic inclusions in neurologically normal elderly: prodromal multiple system atrophy? *Acta Neuropathol.* 116, 269–275.
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002). α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 4, 160–164.
- Furlong, M., Tanner, C.M., Goldman, S.M., Bhudhikanok, G.S., Blair, A., Chade, A., Comyns, K., Hoppin, J.A., Kasten, M., Korell, M., et al. (2015). Protective glove use and hygiene habits modify the associations of specific pesticides with Parkinson's disease. *Environ Int* 75, 144–150.
- Fusco, G., Pape, T., Stephens, A.D., Mahou, P., Costa, A.R., Kaminski, C.F., Kaminski Schierle, G.S., Vendruscolo, M., Veglia, G., Dobson, C.M., et al. (2016). Structural basis of synaptic vesicle assembly promoted by α -synuclein. *Nat Commun* 7, 12563.
- Gajdusek, D.C., and Zigas, V. (1959). Kuru; clinical, pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the Eastern Highlands of New Guinea. *Am. J. Med.* 26, 442–469.
- Gajdusek, D.C., Jun, C.J.G., and Alpers, M. (1966). Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees. *Nature* 209, 794–796.
- Garcia-Reitböck, P., Anichtchik, O., Bellucci, A., Iovino, M., Ballini, C., Fineberg, E., Ghetti, B., Della Corte, L., Spano, P., Tofaris, G.K., et al. (2010). SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Brain* 133, 2032–2044.
- Garey, S.T. (2015). Scrapie 101 for Sheep and Goat Producers.
- Gasset, M., Baldwin, M.A., Fletterick, R.J., and Prusiner, S.B. (1993). Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1–5.
- Gath, J., Bousset, L., Habenstein, B., Melki, R., Böckmann, A., and Meier, B.H. (2014). Unlike twins: an NMR comparison of two α -synuclein polymorphs featuring different toxicity. *PLoS ONE* 9, e90659.
- Ghosh, D., Mondal, M., Mohite, G.M., Singh, P.K., Ranjan, P., Anoop, A., Ghosh, S.,

- Jha, N.N., Kumar, A., and Maji, S.K. (2013). The Parkinson's disease-associated H50Q mutation accelerates α -Synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry* 52, 6925–6927.
- Ghosh, D., Sahay, S., Ranjan, P., Salot, S., Mohite, G.M., Singh, P.K., Dwivedi, S., Carvalho, E., Banerjee, R., Kumar, A., et al. (2014). The newly discovered Parkinson's disease associated Finnish mutation (A53E) attenuates α -synuclein aggregation and membrane binding. *Biochemistry* 53, 6419–6421.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290, 985–989.
- Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* 276, 2380–2386.
- Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C., Asher, D.M., Alpers, M.P., Beck, E., Daniel, P.M., and Matthews, W.B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161, 388–389.
- Gilman, S., Low, P.A., Quinn, N., Albanese, A., Ben-Shlomo, Y., Fowler, C.J., Kaufmann, H., Klockgether, T., Lang, A.E., Lantos, P.L., et al. (1999). Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *J. Neurol. Sci.* 163, 94–98.
- Gilman, S., Wenning, G.K., Low, P.A., Brooks, D.J., Mathias, C.J., Trojanowski, J.Q., Wood, N.W., Colosimo, C., Dürr, A., Fowler, C.J., et al. (2008). Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 71, 670–676.
- Gitler, A.D., Bevis, B.J., Shorter, J., Strathearn, K.E., Hamamichi, S., Su, L.J., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Rochet, J.-C., McCaffery, J.M., et al. (2008). The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 145–150.
- Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428.
- Goedert, M. (2015). NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science* 349, 1255555.
- Goedert, M., and Spillantini, M.G. (1998). Lewy body diseases and multiple system atrophy as alpha-synucleinopathies. *Mol. Psychiatry* 3, 462–465.
- Goedert, M., Jakes, R., and Spillantini, M.G. (1998). Alpha-synuclein and the Lewy body. *NeuroSci* 1, 47–52.
- Goedert, M., Jakes, R., and Spillantini, M.G. (2017). The Synucleinopathies: Twenty Years On. *J Parkinsons Dis* 7, S51–S69.
- Golbe, L.I., Di Iorio, G., Bonavita, V., Miller, D.C., and Duvoisin, R.C. (1990). A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 27, 276–282.
- Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895–899.
- Gordon, W.S. (1946). Advances in veterinary research. *Vet. Rec.* 58, 516–525.
- Graham, J.G., and Oppenheimer, D.R. (1969). Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 32, 28–34.
- Greffard, S., Verny, M., Bonnet, A.-M., Seilhean, D., Hauw, J.-J., and Duyckaerts, C. (2010). A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. *Neurobiol. Aging* 31, 99–103.

- Griffith, J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043–1044.
- Grovesman, B.R., Orrù, C.D., Hughson, A.G., Raymond, L.D., Zanusso, G., Ghetti, B., Campbell, K.J., Safar, J., Galasko, D., and Caughey, B. (2018). Rapid and ultra-sensitive quantitation of disease-associated α -synuclein seeds in brain and cerebrospinal fluid by α Syn RT-QuIC. *Acta Neuropathol Commun* 6, 7.
- Guerrero-Ferreira, R., Taylor, N.M., Mona, D., Ringler, P., Lauer, M.E., Riek, R., Britschgi, M., and Stahlberg, H. (2018). Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *Elife* 7.
- Guo, J.L., Covell, D.J., Daniels, J.P., Iba, M., Stieber, A., Zhang, B., Riddle, D.M., Kwong, L.K., Xu, Y., Trojanowski, J.Q., et al. (2013). Distinct α -synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell* 154, 103–117.
- Hadlow (1959). Scrapie and kuru. *Lancet* (London, England) 289–290.
- Halliday, G., Hely, M., Reid, W., and Morris, J. (2008). The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 115, 409–415.
- Hansen, C., Angot, E., Bergström, A.-L., Steiner, J.A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T.F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., et al. (2011). α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J. Clin. Invest.* 121, 715–725.
- Hantraye, P., Varastet, M., Peschanski, M., Riche, D., Cesaro, P., Willer, J.C., and Maziere, M. (1993). Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. *Neuroscience* 53, 169–178.
- Hawkes, C.H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2007). Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 599–614.
- Hely, M.A., Morris, J.G.L., Reid, W.G.J., and Trafficante, R. (2005). Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov. Disord.* 20, 190–199.
- Hely, M.A., Reid, W.G.J., Adena, M.A., Halliday, G.M., and Morris, J.G.L. (2008). The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov. Disord.* 23, 837–844.
- Herva, M.E., Zibae, S., Fraser, G., Barker, R.A., Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2014). Anti-amyloid compounds inhibit α -synuclein aggregation induced by protein misfolding cyclic amplification (PMCA). *J. Biol. Chem.* 289, 11897–11905.
- Hervé, D., Porché, M., Cabrejo, L., Guidoux, C., Tournier-Lasserre, E., Nicolas, G., Adle-Biassette, H., Plu, I., Chabriat, H., and Duyckaerts, C. (2018). Fatal A β cerebral amyloid angiopathy 4 decades after a dural graft at the age of 2 years. *Acta Neuropathol.* 135, 801–803.
- Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J., and Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389, 448–450, 526.
- Holmes, B.B., DeVos, S.L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., Ouidja, M.O., Brodsky, F.M., Marasa, J., Bagchi, D.P., et al. (2013). Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E3138–3147.
- Holmqvist, S., Chutna, O., Bousset, L., Aldrin-Kirk, P., Li, W., Björklund, T., Wang, Z.-Y., Roybon, L., Melki, R., and Li, J.-Y. (2014). Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol.* 128, 805–820.
- Hong, D.-P., Fink, A.L., and Uversky, V.N. (2008). Structural characteristics of alpha-

- synuclein oligomers stabilized by the flavonoid baicalein. *J. Mol. Biol.* 383, 214–223.
- Hornemann, S., Korth, C., Oesch, B., Riek, R., Wider, G., Wüthrich, K., and Glockshuber, R. (1997). Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett.* 413, 277–281.
- Hughson, A.G., Race, B., Kraus, A., Sangaré, L.R., Robins, L., Groveman, B.R., Saijo, E., Phillips, K., Contreras, L., Dhaliwal, V., et al. (2016). Inactivation of Prions and Amyloid Seeds with Hypochlorous Acid. *PLoS Pathog.* 12, e1005914.
- Hurtrel d'Arboval, L.-H.-J. (1777-1839) A. du texte (1828). *Dictionnaire de médecine et de chirurgie vétérinaires. Tome 4 page 343-344.*
- Ibáñez, P., Bonnet, A.-M., Débarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Dürr, A., and Brice, A. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1169–1171.
- Ilijina, M., Garcia, G.A., Horrocks, M.H., Tosatto, L., Choi, M.L., Ganzinger, K.A., Abramov, A.Y., Gandhi, S., Wood, N.W., Cremades, N., et al. (2016). Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E1206-1215.
- Ivanovski, D. (1892). Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. (Concerning the mosaic disease of tobacco plant. Traduit par J. Johnson. 1942. *Phytopathological classics. Amer. Phytopathol. Soc., no. 7.*). *St. Petersburg Acad. Imp. Sci. Bul.* 67–70.
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., and Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14, 467–475.
- Jahn, T.R., and Radford, S.E. (2008). Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* 469, 100–117.
- Jakes, R., Spillantini, M.G., and Goedert, M. (1994). Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* 345, 27–32.
- Jakob, A. (1921). Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen befunde. *Z. f. d. g. Neur. u. Psych.* 64, 147–228.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 368–376.
- Jao, C.C., Hegde, B.G., Chen, J., Haworth, I.S., and Langen, R. (2008). Structure of membrane-bound alpha-synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19666–19671.
- Jaunmuktane, Z., Quaegebeur, A., Taipa, R., Viana-Baptista, M., Barbosa, R., Koriath, C., Sciot, R., Mead, S., and Brandner, S. (2018). Evidence of amyloid- β cerebral amyloid angiopathy transmission through neurosurgery. *Acta Neuropathol* 135, 671–679.
- Jellinger, K.A. (2008). A critical reappraisal of current staging of Lewy-related pathology in human brain. *Acta Neuropathol.* 116, 1–16.
- Jellinger, K.A. (2018). Multiple System Atrophy: An Oligodendroglioneural Synucleinopathy1. *J. Alzheimers Dis.* 62, 1141–1179.
- Jellinger, K.A., Seppi, K., and Wenning, G.K. (2005). Grading of neuropathology in multiple system atrophy: proposal for a novel scale. *Mov. Disord.* 20 Suppl 12, S29-36.
- Jensen, P.H., Nielsen, M.S., Jakes, R., Dotti, C.G., and Goedert, M. (1998). Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *J. Biol. Chem.* 273, 26292–26294.

- Ji, H., Liu, Y.E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., Joseph, B.K., Rosen, C., and Shi, Y.E. (1997). Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res.* 57, 759–764.
- Jung, B.C., Lim, Y.-J., Bae, E.-J., Lee, J.S., Choi, M.S., Lee, M.K., Lee, H.-J., Kim, Y.S., and Lee, S.-J. (2017). Amplification of distinct α -synuclein fibril conformers through protein misfolding cyclic amplification. *Exp. Mol. Med.* 49, e314.
- Kadavath, H., Hofele, R.V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 7501–7506.
- Kalaitzakis, M.E., Graeber, M.B., Gentleman, S.M., and Pearce, R.K.B. (2008). The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of alpha-synuclein staging. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34, 284–295.
- Kalia, L.V., and Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896–912.
- Kamp, F., Exner, N., Lutz, A.K., Wender, N., Hegermann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K., et al. (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J.* 29, 3571–3589.
- Kang, S.-C., Brown, D.R., Whiteman, M., Li, R., Pan, T., Perry, G., Wisniewski, T., Sy, M.-S., and Wong, B.-S. (2004). Prion protein is ubiquitinated after developing protease resistance in the brains of scrapie-infected mice. *J. Pathol.* 203, 603–608.
- Kiely, A.P., Asi, Y.T., Kara, E., Limousin, P., Ling, H., Lewis, P., Proukakis, C., Quinn, N., Lees, A.J., Hardy, J., et al. (2013). α -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol.* 125, 753–769.
- Killinger, B.A., Madaj, Z., Sikora, J.W., Rey, N., Haas, A.J., Vepa, Y., Lindqvist, D., Chen, H., Thomas, P.M., Brundin, P., et al. (2018). The vermiform appendix impacts the risk of developing Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 10.
- Kim, C., Lv, G., Lee, J.S., Jung, B.C., Masuda-Suzukake, M., Hong, C.-S., Valera, E., Lee, H.-J., Paik, S.R., Hasegawa, M., et al. (2016). Exposure to bacterial endotoxin generates a distinct strain of α -synuclein fibril. *Sci Rep* 6, 30891.
- Kim, H.-J., Jeon, B.S., Kim, Y.E., Kim, J.-Y., Kim, Y.K., Sohn, C.-H., Yun, J.Y., Jeon, S., Lee, J.-M., and Lee, J.-Y. (2013). Clinical and imaging characteristics of dementia in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat. Disord.* 19, 617–621.
- Kimberlin, R.H., and Walker, C. (1977). Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J. Gen. Virol.* 34, 295–304.
- Kimberlin, R.H., and Walker, C.A. (1978). Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J. Gen. Virol.* 39, 487–496.
- Kimberlin, R.H., and Walker, C.A. (1979). Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J. Comp. Pathol.* 89, 551–562.
- Kingsbury, A.E., Bandopadhyay, R., Silveira-Moriyama, L., Ayling, H., Kallis, C., Sterlacci, W., Maeir, H., Poewe, W., and Lees, A.J. (2010). Brain stem pathology in Parkinson's disease: an evaluation of the Braak staging model. *Mov. Disord.* 25, 2508–2515.
- Kitayama, M., Wada-Isoe, K., Irizawa, Y., and Nakashima, K. (2009). Assessment of dementia in patients with multiple system atrophy. *Eur. J. Neurol.* 16, 589–594.
- Klitzman, R.L., Alpers, M.P., and Gajdusek, D.C. (1984). The Natural Incubation Period of Kuru and the Episodes of Transmission in Three Clusters of Patients.

NED 3, 3–20.

- Koga, S., Aoki, N., Uitti, R.J., van Gerpen, J.A., Cheshire, W.P., Josephs, K.A., Wszolek, Z.K., Langston, J.W., and Dickson, D.W. (2015). When DLB, PD, and PSP masquerade as MSA: an autopsy study of 134 patients. *Neurology* 85, 404–412.
- Kordower, J.H., and Brundin, P. (2009). Lewy body pathology in long-term fetal nigral transplants: is Parkinson's disease transmitted from one neural system to another? *Neuropsychopharmacology* 34, 254.
- Kordower, J.H., and Olanow, C.W. (2016). Fetal grafts for Parkinson's disease: Decades in the making. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 6332–6334.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., and Olanow, C.W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* 14, 504–506.
- Kordower, J.H., Dodiya, H.B., Kordower, A.M., Terpstra, B., Paumier, K., Madhavan, L., Sortwell, C., Steece-Collier, K., and Collier, T.J. (2011). Transfer of host-derived α synuclein to grafted dopaminergic neurons in rat. *Neurobiol. Dis.* 43, 552–557.
- Kordower, J.H., Olanow, C.W., Dodiya, H.B., Chu, Y., Beach, T.G., Adler, C.H., Halliday, G.M., and Bartus, R.T. (2013). Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain* 136, 2419–2431.
- Kosaka, K. (1978). Lewy bodies in cerebral cortex, report of three cases. *Acta Neuropathol.* 42, 127–134.
- Kosaka, K. (1990). Diffuse Lewy body disease in Japan. *J. Neurol.* 237, 197–204.
- Kosaka, K. (2014). Lewy body disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 90, 301–306.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Eppelen, J.T., Schöls, L., and Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18, 106–108.
- Kumar, H., Singh, J., Kumari, P., and Udgaonkar, J.B. (2017). Modulation of the extent of structural heterogeneity in α -synuclein fibrils by the small molecule thioflavin T. *J. Biol. Chem.* 292, 16891–16903.
- Kupsky, W.J., Grimes, M.M., Sweeting, J., Bertsch, R., and Cote, L.J. (1987). Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology* 37, 1253–1255.
- Labbadia, J., and Morimoto, R.I. (2014). Proteostasis and longevity: when does aging really begin? *F1000Prime Rep* 6.
- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurler, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379.
- Lebouvier, T., Chaumette, T., Damier, P., Coron, E., Toucheffeu, Y., Vrignaud, S., Naveilhan, P., Galmiche, J.-P., Bruley des Varannes, S., Derkinderen, P., et al. (2008). Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* 57, 1741–1743.
- Lebouvier, T., Chaumette, T., Paillusson, S., Duyckaerts, C., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2009). The second brain and Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 30, 735–741.
- Lee, C., and Yu, M. (2005). Protein folding and disease. *J Biochem Mol Biol.*
- Lee, C.S., Schulzer, M., Mak, E.K., Snow, B.J., Tsui, J.K., Calne, S., Hammerstad, J., and Calne, D.B. (1994). Clinical observations on the rate of progression of

- idiopathic parkinsonism. *Brain* 117 (Pt 3), 501–507.
- Lee, H.-J., Suk, J.-E., Bae, E.-J., Lee, J.-H., Paik, S.R., and Lee, S.-J. (2008). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1835–1849.
- Leeuwenhoek, A.V. (1673). A specimen of some observations made by a microscope, contrived by M. Leewenhoek in Holland, lately communicated by Dr. Regnerus de Graaf. *Phil. Trans.* 8, 6037–6038.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.-O.B., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science* 305, 673–676.
- Legname, G., Nguyen, H.-O.B., Baskakov, I.V., Cohen, F.E., Dearmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2005). Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2168–2173.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., et al. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395, 451–452.
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honoré, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Dürr, A., Melki, R., et al. (2013). G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann. Neurol.* 73, 459–471.
- Levinthal, C. (1969). How to fold graciously. In: Debrunner, P., Tsibris, J.C.M., Munck, E. (Eds.), *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems, Proceeding of Meeting Held at Allerton House, Monticello, Illinois*. University of Illinois Press, Urbana.
- Lewy, F. (1912). Paralysis agitans. *Handbuch Der Neurologie* 3, 920–933.
- Li, B., Ge, P., Murray, K.A., Sheth, P., Zhang, M., Nair, G., Sawaya, M.R., Shin, W.S., Boyer, D.R., Ye, S., et al. (2018a). Cryo-EM of full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel. *Nat Commun* 9, 3609.
- Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Björklund, A., et al. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 14, 501–503.
- Li, J.-Y., Englund, E., Widner, H., Rehncrona, S., Björklund, A., Lindvall, O., and Brundin, P. (2010). Characterization of Lewy body pathology in 12- and 16-year-old intrastratial mesencephalic grafts surviving in a patient with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 25, 1091–1096.
- Li, W., Englund, E., Widner, H., Mattsson, B., van Westen, D., Lätt, J., Rehncrona, S., Brundin, P., Björklund, A., Lindvall, O., et al. (2016). Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 6544–6549.
- Li, X.-H., Culver, J.A., and Rhoades, E. (2015). Tau Binds to Multiple Tubulin Dimers with Helical Structure. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 9218–9221.
- Li, Y., Zhao, C., Luo, F., Liu, Z., Gui, X., Luo, Z., Zhang, X., Li, D., Liu, C., and Li, X. (2018b). Amyloid fibril structure of α -synuclein determined by cryo-electron microscopy. *Cell Res.* 28, 897–903.
- Liberski, P.P. (2009). Kuru and D. Carleton Gajdusek: a close encounter. *Folia Neuropathol* 47, 114–137.
- Lim, Y., Kehm, V.M., Lee, E.B., Soper, J.H., Li, C., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2011). α -Syn suppression reverses synaptic and memory defects in a mouse model of dementia with Lewy bodies. *J. Neurosci.* 31, 10076–10087.
- Liu, G., Zhang, C., Yin, J., Li, X., Cheng, F., Li, Y., Yang, H., Uéda, K., Chan, P., and Yu, S. (2009). alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from

- different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci. Lett.* **454**, 187–192.
- Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N.B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., and James, T.L. (1999). Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry* **38**, 5362–5377.
- Lowenstein, D.H., Butler, D.A., Westaway, D., McKinley, M.P., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1990). Three hamster species with different scrapie incubation times and neuropathological features encode distinct prion proteins. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1153–1163.
- Lu, L., Zhang, C., Cai, Q., Lu, Q., Duan, C., Zhu, Y., and Yang, H. (2013). Voltage-dependent anion channel involved in the α -synuclein-induced dopaminergic neuron toxicity in rats. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **45**, 170–178.
- Luk, K.C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J.R., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2009). Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 20051–20056.
- Luk, K.C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2012a). Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* **338**, 949–953.
- Luk, K.C., Kehm, V.M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2012b). Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. *J. Exp. Med.* **209**, 975–986.
- Luk, K.C., Covell, D.J., Kehm, V.M., Zhang, B., Song, I.Y., Byrne, M.D., Pitkin, R.M., Decker, S.C., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2016). Molecular and Biological Compatibility with Host Alpha-Synuclein Influences Fibril Pathogenicity. *Cell Rep* **16**, 3373–3387.
- Ma, M.-R., Hu, Z.-W., Zhao, Y.-F., Chen, Y.-X., and Li, Y.-M. (2016). Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation. *Sci Rep* **6**, 37130.
- Makky, A., Bousset, L., Polesel-Maris, J., and Melki, R. (2016). Nanomechanical properties of distinct fibrillar polymorphs of the protein α -synuclein. *Scientific Reports* **6**, 37970.
- Maroteaux, L., Campanelli, J.T., and Scheller, R.H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* **8**, 2804–2815.
- Marras, C., and Lang, A. (2013). Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **84**, 409–415.
- Martikainen, M.H., Päivärinta, M., Hietala, M., and Kaasinen, V. (2015). Clinical and imaging findings in Parkinson disease associated with the A53E SNCA mutation. *Neurol Genet* **1**, e27.
- Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D.M.A., and Hasegawa, M. (2013). Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain* **136**, 1128–1138.
- Mayo, M.C., and Bordelon, Y. (2014). Dementia with Lewy bodies. *Semin Neurol* **34**, 182–188.
- Mc Gowan, J.P. (1922). Scrapie in sheep. *Scottish Journal of Agriculture* **5**, 365–376.
- McCann, H., Stevens, C.H., Cartwright, H., and Halliday, G.M. (2014). α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism Relat. Disord.* **20 Suppl 1**, S62-67.
- McKee, A.C., Stern, R.A., Nowinski, C.J., Stein, T.D., Alvarez, V.E., Daneshvar, D.H., Lee, H.-S., Wojtowicz, S.M., Hall, G., Baugh, C.M., et al. (2013). The spectrum of

- disease in chronic traumatic encephalopathy. *Brain* 136, 43–64.
- McKeith, I.G. (2006). Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the Consortium on DLB International Workshop. *J. Alzheimers Dis.* 9, 417–423.
- McKeith, I.G., Galasko, D., Kosaka, K., Perry, E.K., Dickson, D.W., Hansen, L.A., Salmon, D.P., Lowe, J., Mirra, S.S., Byrne, E.J., et al. (1996). Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 47, 1113–1124.
- McKeith, I.G., Dickson, D.W., Lowe, J., Emre, M., O'Brien, J.T., Feldman, H., Cummings, J., Duda, J.E., Lippa, C., Perry, E.K., et al. (2005). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 65, 1863–1872.
- McKinley, M.P., Masiarz, F.R., and Prusiner, S.B. (1981). Reversible chemical modification of the scrapie agent. *Science* 214, 1259–1261.
- McNaught, K.S., Olanow, C.W., Halliwell, B., Isacson, O., and Jenner, P. (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 589–594.
- Melki, R. (2018a). How the shapes of seeds can influence pathology. *Neurobiol. Dis.* 109, 201–208.
- Melki, R. (2018b). Alpha-synuclein and the prion hypothesis in Parkinson's disease. *Rev. Neurol. (Paris)*.
- Meulener, M.C., Xu, K., Thomson, L., Thompson, L., Ischiropoulos, H., and Bonini, N.M. (2006). Mutational analysis of DJ-1 in *Drosophila* implicates functional inactivation by oxidative damage and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12517–12522.
- Millson, G.C., and Manning, E.J. (1979). in *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System* (eds Prusiner, S. B. & Hadlow, W. J.) (Academic, New York). 2, 409.
- Mizuno, N., Varkey, J., Kegulian, N.C., Hegde, B.G., Cheng, N., Langen, R., and Steven, A.C. (2012). Remodeling of lipid vesicles into cylindrical micelles by α -synuclein in an extended α -helical conformation. *J. Biol. Chem.* 287, 29301–29311.
- Moreno-Gonzalez, I., and Soto, C. (2011). Misfolded protein aggregates: mechanisms, structures and potential for disease transmission. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 482–487.
- Mougenot, A.-L., Nicot, S., Bencsik, A., Morniat, E., Verchère, J., Lakhdar, L., Legastelois, S., and Baron, T. (2012). Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* 33, 2225–2228.
- Münch, C., and Bertolotti, A. (2012). Propagation of the prion phenomenon: beyond the seeding principle. *J. Mol. Biol.* 421, 491–498.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1–13.
- Nakamura, K., Nemani, V.M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J.M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., et al. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 286, 20710–20726.
- Narhi, L., Wood, S.J., Steavenson, S., Jiang, Y., Wu, G.M., Anafi, D., Kaufman, S.A., Martin, F., Sitney, K., Denis, P., et al. (1999). Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J. Biol. Chem.* 274, 9843–9846.
- Näsström, T. (2011). Characterization of alpha-synuclein oligomers. Uppsala

Universitet.

- Noyce, A.J., Bestwick, J.P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C.H., Giovannoni, G., Lees, A.J., and Schrag, A. (2012). Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 72, 893–901.
- Noyce, A.J., Lees, A.J., and Schrag, A.-E. (2016). The prediagnostic phase of Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87, 871–878.
- Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., and Hood, L.E. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735–746.
- Okazaki, H., Lipkin, L.E., and Aronson, S.M. (1961). Diffuse intracytoplasmic ganglionic inclusions (Lewy type) associated with progressive dementia and quadriplegia in flexion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 20, 237–244.
- Olanow, C.W., and Prusiner, S.B. (2009). Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 12571–12572.
- Osterberg, V.R., Spinelli, K.J., Weston, L.J., Luk, K.C., Woltjer, R.L., and Unni, V.K. (2015). Progressive aggregation of alpha-synuclein and selective degeneration of lewy inclusion-bearing neurons in a mouse model of parkinsonism. *Cell Rep* 10, 1252–1260.
- Oueslati, A., Fournier, M., and Lashuel, H.A. (2010). Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. *Prog. Brain Res.* 183, 115–145.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., and Cohen, F.E. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10962–10966.
- Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., Knels, L., Pursche, S., Jung, R., Jackson, S., Gille, G., Spillantini, M.G., Reichmann, H., et al. (2010). Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS ONE* 5, e8762.
- Pan-Montojo, F., Schwarz, M., Winkler, C., Arnhold, M., O'Sullivan, G.A., Pal, A., Said, J., Marsico, G., Verbavatz, J.-M., Rodrigo-Angulo, M., et al. (2012). Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. *Scientific Reports* 2, 898.
- Papka, M., Rubio, A., and Schiffer, R.B. (1998). A review of Lewy body disease, an emerging concept of cortical dementia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 10, 267–279.
- Papp, M.I., Kahn, J.E., and Lantos, P.L. (1989). Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J. Neurol. Sci.* 94, 79–100.
- Parkinson, J. (1817). *An essay on the shaking palsy.*
- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Pöyhönen, M., and Paetau, A. (2014). Novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol. Aging* 35, 2180.e1-5.
- Pasteur, L. (1822-1895) *A. du texte*, Joubert, J. (1834-1910) *A. du texte*, and Chamberland, C. (1851-1908) *A. du texte* (1878). *La théorie des germes et ses applications à la médecine et à la chirurgie / lecture faite à l'Académie de médecine par M. Pasteur en son nom et au nom de MM. Joubert et Chamberland,*

- le 30 avril 1878.
- Pattison, I.H. (1965a). RESISTANCE OF THE SCRAPIE AGENT TO FORMALIN. *J. Comp. Pathol.* 75, 159–164.
- Pattison, I.H. (1965b). Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. In *Slow, Latent and Temperate Virus Infections.*, (Washington, D.C.: D. C. Gajdusek, C. J. Gibbs, Jr., and M. P. Alpers), pp. 249–257.
- Pattison, I.H., and Jones, K.M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet. Rec.* 80, 2–9.
- Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van den Haute, C., Melki, R., and Baekelandt, V. (2015). α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522, 340–344.
- Peelaerts, W., Bousset, L., Baekelandt, V., and Melki, R. (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 Res.* 373, 195–212.
- Pemberton, S. (2011). Molecular chaperones in the assembly of α -synuclein and Parkinson's disease. *Université Paris-Sud* 11.
- Perrin, R.J., Woods, W.S., Clayton, D.F., and George, J.M. (2000). Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 34393–34398.
- Pfeiffer, R.F. (2003). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2, 107–116.
- Phan, H.T.M., Bartz, J.C., Ayers, J., Giasson, B.I., Schubert, M., Rodenhausen, K.B., Kananizadeh, N., Li, Y., and Bartelt-Hunt, S.L. (2018). Adsorption and decontamination of α -synuclein from medically and environmentally-relevant surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 166, 98–107.
- Phillips, R.J., Walter, G.C., Wilder, S.L., Baronowsky, E.A., and Powley, T.L. (2008). Alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: autonomic pathway implicated in Parkinson's disease? *Neuroscience* 153, 733–750.
- Pieri, L., Madiona, K., Bousset, L., and Melki, R. (2012). Fibrillar α -synuclein and huntingtin exon 1 assemblies are toxic to the cells. *Biophys. J.* 102, 2894–2905.
- Pieri, L., Madiona, K., and Melki, R. (2016). Structural and functional properties of prefibrillar α -synuclein oligomers. *Sci Rep* 6, 24526.
- Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A., et al. (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274, 1197–1199.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047.
- Postuma, R.B., Aarsland, D., Barone, P., Burn, D.J., Hawkes, C.H., Oertel, W., and Ziemssen, T. (2012). Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 27, 617–626.
- Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., Rouaud, T., Flamant, M., Toulgoat, F., Roy, M., Vavasseur, F., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., et al. (2012). Analysis of

- colonic alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat. Disord.* *18*, 893–895.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., and Steeves, T.D.L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* *29*, 1583–1590.
- Proukakis, C., Dudzik, C.G., Brier, T., MacKay, D.S., Cooper, J.M., Millhauser, G.L., Houlden, H., and Schapira, A.H. (2013). A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* *80*, 1062–1064.
- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* *216*, 136–144.
- Prusiner, S.B. (2012). Cell biology. A unifying role for prions in neurodegenerative diseases. *Science* *336*, 1511–1513.
- Prusiner, S.B. (2013). Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu. Rev. Genet.* *47*, 601–623.
- Prusiner, S.B., Groth, D.F., Cochran, S.P., Masiarz, F.R., McKinley, M.P., and Martinez, H.M. (1980). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* *19*, 4883–4891.
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Groth, D.F., Bowman, K.A., Mock, N.I., Cochran, S.P., and Masiarz, F.R. (1981). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *78*, 6675–6679.
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F., and Glenner, G.G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* *35*, 349–358.
- Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.M., Groth, D., Miranda, C., Torchia, M., Yang, S.L., Serban, D., and Carlson, G.A. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* *63*, 673–686.
- Prusiner, S.B., Woerman, A.L., Mordes, D.A., Watts, J.C., Rampersaud, R., Berry, D.B., Patel, S., Oehler, A., Lowe, J.K., Kravitz, S.N., et al. (2015). Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, E5308-5317.
- Recasens, A., Dehay, B., Bové, J., Carballo-Carbajal, I., Dovero, S., Pérez-Villalba, A., Fernagut, P.-O., Blesa, J., Parent, A., Perier, C., et al. (2014). Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann. Neurol.* *75*, 351–362.
- Rey, N.L., Petit, G.H., Bousset, L., Melki, R., and Brundin, P. (2013). Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathol.* *126*, 555–573.
- Rey, N.L., George, S., and Brundin, P. (2016). Review: Spreading the word: precise animal models and validated methods are vital when evaluating prion-like behaviour of alpha-synuclein. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *42*, 51–76.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* *382*, 180–182.
- Roostae, A., Beaudoin, S., Staskevicius, A., and Roucou, X. (2013). Aggregation and neurotoxicity of recombinant α -synuclein aggregates initiated by dimerization. *Mol Neurodegener* *8*, 5.
- Rutherford, N.J., Moore, B.D., Golde, T.E., and Giasson, B.I. (2014). Divergent effects of the H50Q and G51D SNCA mutations on the aggregation of α -synuclein.

- J. Neurochem. 131, 859–867.
- Saborio, G.P., Permanne, B., and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810–813.
- Sacino, A.N., Brooks, M., Thomas, M.A., McKinney, A.B., Lee, S., Regenhardt, R.W., McGarvey, N.H., Ayers, J.I., Notterpek, L., Borchelt, D.R., et al. (2014). Intramuscular injection of α -synuclein induces CNS α -synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 10732–10737.
- Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J. (1993). Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci.* 2, 2206–2216.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* 4, 1157–1165.
- Samuel, F., Flavin, W.P., Iqbal, S., Pacelli, C., Sri Renganathan, S.D., Trudeau, L.-E., Campbell, E.M., Fraser, P.E., and Tandon, A. (2016). Effects of Serine 129 Phosphorylation on α -Synuclein Aggregation, Membrane Association, and Internalization. *J. Biol. Chem.* 291, 4374–4385.
- Sano, K., Atarashi, R., Satoh, K., Ishibashi, D., Nakagaki, T., Iwasaki, Y., Yoshida, M., Murayama, S., Mishima, K., and Nishida, N. (2018). Prion-Like Seeding of Misfolded α -Synuclein in the Brains of Dementia with Lewy Body Patients in RT-QUIC. *Mol. Neurobiol.* 55, 3916–3930.
- Schapira, A.H.V. (2009). Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 41–47.
- Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., and Quinn, N.P. (1999). Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* 354, 1771–1775.
- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Wälchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S.J., et al. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59, 847–857.
- Serpell, L.C., Berriman, J., Jakes, R., Goedert, M., and Crowther, R.A. (2000). Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4897–4902.
- Shahnawaz, M., Tokuda, T., Waragai, M., Mendez, N., Ishii, R., Trenkwalder, C., Mollenhauer, B., and Soto, C. (2017). Development of a Biochemical Diagnosis of Parkinson Disease by Detection of α -Synuclein Misfolded Aggregates in Cerebrospinal Fluid. *JAMA Neurol* 74, 163–172.
- Shen, J., Du, T., Wang, X., Duan, C., Gao, G., Zhang, J., Lu, L., and Yang, H. (2014). α -Synuclein amino terminus regulates mitochondrial membrane permeability. *Brain Res.* 1591, 14–26.
- Shi, Z., Sachs, J.N., Rhoades, E., and Baumgart, T. (2015). Biophysics of α -synuclein induced membrane remodelling. *Phys Chem Chem Phys* 17, 15561–15568.
- Shin, J., Park, S.-H., Shin, C., Kim, J.-H., Yun, T.J., Kim, H.-J., and Jeon, B. (2018). Submandibular gland is a suitable site for alpha synuclein pathology in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*
- Shrivastava, A.N., Redeker, V., Fritz, N., Pieri, L., Almeida, L.G., Spolidoro, M., Liebmann, T., Bousset, L., Renner, M., Léna, C., et al. (2015). α -synuclein assemblies sequester neuronal α 3-Na⁺/K⁺-ATPase and impair Na⁺ gradient.

- EMBO J. 34, 2408–2423.
- Shrivastava, A.N., Aperia, A., Melki, R., and Triller, A. (2017). Physico-Pathologic Mechanisms Involved in Neurodegeneration: Misfolded Protein-Plasma Membrane Interactions. *Neuron* 95, 33–50.
- Shy, G.M., and Drager, G.A. (1960). A neurological syndrome associated with orthostatic hypotension: a clinical-pathologic study. *Arch. Neurol.* 2, 511–527.
- Sigurdsson, B. (1954). RIDA, A Chronic Encephalitis of Sheep: With General Remarks on Infections Which Develop Slowly and Some of Their Special Characteristics. *British Veterinary Journal* 110, 341–354.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.
- Snyder, H., Mensah, K., Theisler, C., Lee, J., Matouschek, A., and Wolozin, B. (2003). Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J. Biol. Chem.* 278, 11753–11759.
- Somerville, R.A., and Ritchie, L.A. (1990). Differential glycosylation of the protein (PrP) forming scrapie-associated fibrils. *J. Gen. Virol.* 71 (Pt 4), 833–839.
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 49–60.
- Soto, C. (2012). Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell* 149, 968–977.
- Soto, C., and Satani, N. (2011). The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Trends Mol Med* 17, 14–24.
- Soto, C., Saborio, G.P., and Anderes, L. (2002). Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci.* 25, 390–394.
- Spillantini, M.G., and Goedert, M. (2000). The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920, 16–27.
- Spillantini, M.G., Divane, A., and Goedert, M. (1995). Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics* 27, 379–381.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840.
- Spillantini, M.G., Anthony Crowther, R., Jakes, R., Cairns, N.J., Lantos, P.L., and Goedert, M. (1998a). Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neuroscience Letters* 251, 205–208.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998b). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6469–6473.
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32, 1991–2002.
- Stankovic, I., Krismer, F., Jesic, A., Antonini, A., Benke, T., Brown, R.G., Burn, D.J., Holton, J.L., Kaufmann, H., Kostic, V.S., et al. (2014). Cognitive impairment in multiple system atrophy: a position statement by the Neuropsychology Task Force of the MDS Multiple System Atrophy (MODIMSA) study group. *Mov. Disord.* 29, 857–867.

- Steiner, J.A., Angot, E., and Brundin, P. (2011). A deadly spread: cellular mechanisms of α -synuclein transfer. *Cell Death Differ.* 18, 1425–1433.
- Stöckel, J., and Hartl, F.U. (2001). Chaperonin-mediated de novo generation of prion protein aggregates. *J. Mol. Biol.* 313, 861–872.
- Stroylova, Y.Y., Kiselev, G.G., Schmalhausen, E.V., and Muronetz, V.I. (2014). Prions and chaperones: friends or foes? *Biochemistry Mosc.* 79, 761–775.
- Tang, Y.-C., Chang, H.-C., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2007). SnapShot: molecular chaperones, Part II. *Cell* 128, 412.
- Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., et al. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 119, 866–872.
- Tarutani, A., Arai, T., Murayama, S., Hisanaga, S.-I., and Hasegawa, M. (2018). Potent prion-like behaviors of pathogenic α -synuclein and evaluation of inactivation methods. *Acta Neuropathol Commun* 6, 29.
- Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., and Prusiner, S.B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274, 2079–2082.
- Theillet, F.-X., Binolfi, A., Bekei, B., Martorana, A., Rose, H.M., Stuver, M., Verzini, S., Lorenz, D., van Rossum, M., Goldfarb, D., et al. (2016). Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* 530, 45–50.
- Thobois, S., Delamarre-Damier, F., and Derkinderen, P. (2005). Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 107, 269–281.
- Thomzig, A., Wagenführ, K., Daus, M.L., Joncic, M., Schulz-Schaeffer, W.J., Thanheiser, M., Mielke, M., and Beekes, M. (2014). Decontamination of medical devices from pathological amyloid- β -, tau- and α -synuclein aggregates. *Acta Neuropathol Commun* 2, 151.
- Tison, F., Yekhle, F., Chrysostome, V., and Sourgen, C. (2000). Prevalence of multiple system atrophy. *Lancet* 355, 495–496.
- Tran, H.T., Chung, C.H.-Y., Iba, M., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Luk, K.C., and Lee, V.M.Y. (2014). A-synuclein immunotherapy blocks uptake and templated propagation of misfolded α -synuclein and neurodegeneration. *Cell Rep* 7, 2054–2065.
- Tretiakoff, K. (1919). Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Thèse, université de Paris.
- Trojanowski, J.Q., Revesz, T., and Neuropathology Working Group on MSA (2007). Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 615–620.
- Tyson, T., Senchuk, M., Cooper, J.F., George, S., Van Raamsdonk, J.M., and Brundin, P. (2017). Novel animal model defines genetic contributions for neuron-to-neuron transfer of α -synuclein. *Sci Rep* 7, 7506.
- Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D.A., Kondo, J., Ihara, Y., and Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11282–11286.
- Ulmer, T.S., Bax, A., Cole, N.B., and Nussbaum, R.L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 280, 9595–9603.

- Van Den Eeden, S.K., Tanner, C.M., Bernstein, A.L., Fross, R.D., Leimpeter, A., Bloch, D.A., and Nelson, L.M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am. J. Epidemiol.* *157*, 1015–1022.
- Varastet, M., Riche, D., Maziere, M., and Hantraye, P. (1994). Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience* *63*, 47–56.
- Vargas, K.J., Makani, S., Davis, T., Westphal, C.H., Chandra, S.S., and Castillo, P.E. (2014). Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis. *J. Neurosci.* *34*, 9364–9376.
- Varkey, J., Isas, J.M., Mizuno, N., Jensen, M.B., Bhatia, V.K., Jao, C.C., Petrlova, J., Voss, J.C., Stamou, D.G., Steven, A.C., et al. (2010). Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* *285*, 32486–32493.
- Visanji, N.P., Brooks, P.L., Hazrati, L.-N., and Lang, A.E. (2013). The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. *Acta Neuropathol Commun* *1*, 2.
- Volles, M.J., Lee, S.J., Rochet, J.C., Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Kessler, J.C., and Lansbury, P.T. (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* *40*, 7812–7819.
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., and Ikuta, F. (1988). Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol.* *76*, 217–221.
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F., and Takahashi, H. (2013). The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.* *47*, 495–508.
- Wang, L., Das, U., Scott, D.A., Tang, Y., McLean, P.J., and Roy, S. (2014). α -synuclein multimers cluster synaptic vesicles and attenuate recycling. *Curr. Biol.* *24*, 2319–2326.
- Wang, W., Perovic, I., Chittuluru, J., Kaganovich, A., Nguyen, L.T.T., Liao, J., Auclair, J.R., Johnson, D., Landner, A., Simorellis, A.K., et al. (2011). A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 17797–17802.
- Watts, J.C., Giles, K., Oehler, A., Middleton, L., Dexter, D.T., Gentleman, S.M., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2013). Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 19555–19560.
- Weinreb, P.H., Zhen, W., Poon, A.W., Conway, K.A., and Lansbury, P.T. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* *35*, 13709–13715.
- Weissmann, C. (1991). A "unified theory" of prion propagation. *Nature* *352*, 679–683.
- Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Estibeiro, K., Cousens, S.N., Smith, P.G., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., and Hofman, A. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet* *347*, 921–925.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., et al. (2011). In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 4194–4199.
- Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D., and Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol.* *26 Suppl 1*, S1-58.
- Woerman, A.L., Stöhr, J., Aoyagi, A., Rampersaud, R., Krejciova, Z., Watts, J.C.,

- Ohyama, T., Patel, S., Widjaja, K., Oehler, A., et al. (2015). Propagation of prions causing synucleinopathies in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, E4949-4958.
- Zaccai, J., Brayne, C., McKeith, I., Matthews, F., Ince, P.G., and MRC Cognitive Function, Ageing Neuropathology Study (2008). Patterns and stages of alpha-synucleinopathy: Relevance in a population-based cohort. *Neurology* *70*, 1042–1048.
- Zaltieri, M., Longhena, F., Pizzi, M., Missale, C., Spano, P., and Bellucci, A. (2015). Mitochondrial Dysfunction and α -Synuclein Synaptic Pathology in Parkinson's Disease: Who's on First? *Parkinsons Dis* *2015*, 108029.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., et al. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* *55*, 164–173.
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J.-S., et al. (2005). Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* *19*, 533–542.
- Zhang, Z., Zhang, Y., Wang, F., Wang, X., Xu, Y., Yang, H., Yu, G., Yuan, C., and Ma, J. (2013). De novo generation of infectious prions with bacterially expressed recombinant prion protein. *FASEB J.* *27*, 4768–4775.
- Zharikov, A.D., Cannon, J.R., Tapias, V., Bai, Q., Horowitz, M.P., Shah, V., El Ayadi, A., Hastings, T.G., Greenamyre, J.T., and Burton, E.A. (2015). shRNA targeting α -synuclein prevents neurodegeneration in a Parkinson's disease model. *J. Clin. Invest.* *125*, 2721–2735.
- Zhou, Y., Gu, G., Goodlett, D.R., Zhang, T., Pan, C., Montine, T.J., Montine, K.S., Aebersold, R.H., and Zhang, J. (2004). Analysis of alpha-synuclein-associated proteins by quantitative proteomics. *J. Biol. Chem.* *279*, 39155–39164.
- Zlotnik, I., and Rennie, J.C. (1965). EXPERIMENTAL TRANSMISSION OF MOUSE PASSAGED SCRAPIE TO GOATS, SHEEP, RATS AND HAMSTERS. *J. Comp. Pathol.* *75*, 147–157.

Titre : Typage moléculaire des maladies neurodégénératives dues à l'agrégation de la protéine α -synucléine

Mots clés : α -synucléine ; maladie de Parkinson ; démences à corps de Lewy ; atrophie multi-systématisée ; maladies neurodégénératives ; prion

Résumé : Les synucléinopathies regroupent les maladies neurodégénératives de Parkinson, les démences à corps de Lewy et l'atrophie multi-systématisée. Des études suggèrent que les synucléinopathies seraient des maladies à prion. Aujourd'hui, certains aspects manquent pour que l' α -synucléine soit reconnue comme un prion. Par exemple, il est à démontrer que chaque synucléinopathie est causée par une souche précise d' α -synucléine. Durant ma thèse j'ai mis au point une méthode d'amplification fiable des dépôts présents dans le cerveau des patients atteints de synucléinopathies. J'ai aussi documenté les procédures de nettoyage à adopter envers des matériels souillés, par diverses fibres amyloïdes, afin de réduire le risque de contamination. Finalement, j'ai été associé à une étude montrant les capacités de propagation d'assemblages d' α -synucléine, dans un réseau de neurones humains en culture. Ces résultats permettront des études structurales, et fonctionnelles, des souches d' α -synucléine dans les synucléinopathies.

Title : Molecular typing of neurodegenerative diseases due to the aggregation of the protein α -synuclein

Keywords : α -synuclein ; Parkinson's disease ; dementia with Lewy bodies ; multiple system atrophy; neurodegeneratives diseases ; prion

Abstract : The aggregation of α -synuclein protein has been shown to be associated with Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy, called synucleinopathies. Increasing amount of evidences suggest that synucleinopathies are prion diseases. Some aspects are missing for α -synuclein to be recognized as a prion, such as the existence of strains associated to synucleinopathies. During my thesis I set up a reliable method to amplify α -synuclein-rich deposits from patients tissues. I validated the method using all synucleinopathies tissues. This should allow the identification of α -synuclein strain related to each synucleinopathy. In addition, I also documented cleaning procedures for materials soiled with various amyloid fibers, in order to reduce the risk of contamination. Finally, I was associated to a study that shows the propagation abilities of different α -synuclein assemblies in a neuronal network mimicking human cortico-cortical connections. These results open the way to structural and functional studies of the amplified deposits.

