



HAL
open science

Étude de la propagation prion-like de l'alpha-synucléine dans des réseaux de neurones reconstruits

Josquin Courte

► **To cite this version:**

Josquin Courte. Étude de la propagation prion-like de l'alpha-synucléine dans des réseaux de neurones reconstruits. Neurosciences. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS053 . tel-03364829

HAL Id: tel-03364829

<https://theses.hal.science/tel-03364829>

Submitted on 5 Oct 2021

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Spécialité
Neurosciences / Bioingénierie

École doctorale Cerveau, Cognition, Comportement (Paris, n°158)

Présentée par
Josquin COURTE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

ÉTUDE DE LA PROPAGATION PRION-LIKE DE L'ALPHA-SYNUCLÉINE DANS DES RÉSEAUX DE NEURONES RECONSTRUITS

Dirigée par
Jean-Michel PEYRIN & Catherine VILLARD

Soutenue le
3 octobre 2019

Devant le jury composé de

Marie-Claude POTIER
Vincent BÉRINGUE
Thierry BARON
Carole CROZET
Christophe CULLIN
Jean-Michel PEYRIN
Catherine VILLARD

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directeur de thèse
Directrice de thèse

Remerciements

Il est dur de restituer sous forme de mots la gratitude que j'éprouve à avoir côtoyé tant de beaux spécimens du genre humain pendant ces quatre dernières années. Je vais tout de même tenter de m'y atteler.

Je veux tout d'abord te remercier, Jean-Michel, pour avoir été un mentor si bienveillant, passionné, humain, disponible, patient. La discussion, même si parfois houleuse, a toujours été possible avec toi. Tu m'as permis de poursuivre mes idées, de m'approprier un sujet passionnant, tout en me guidant sur le chemin épineux de la Science. Nous avons traversé quelques événements stressants, qui rendent d'autant plus précieux les jolis projets que tu vas continuer à poursuivre et auxquels tu m'as permis de donner mon apport. Bref, j'espère que tu as pris autant de plaisir que moi à faire ce bout de chemin ensemble, et je compte sur nos dialogues futurs pour m'orienter sur la suite de la route.

C'est une chance rare d'avoir un directeur de thèse avec lequel une entente franche est possible. Je m'estime donc doublement chanceux de t'avoir eue, Catherine, comme co-directrice de thèse. Avec toi aussi, le dialogue a toujours été possible. Ton regard a été très précieux lors de cette thèse, permettant de recentrer les projets et de les rendre plus solides. Je t'ai peut-être moins vue que ce que j'aurais souhaité, mais j'ai toujours eu du bonheur à interragir avec toi sur des sujets scientifiques ou autres. J'espère vivement continuer cette discussion.

Bien sûr, merci à ma famille. Je sais que vous n'êtes pas adeptes des effusions outrancières, mais aussi minime soit nos gestes d'affections, nous savons qu'il est riche en sens. Je vous aime. Sans vous, je ne serais pas ce que je suis maintenant, et pour cela ma reconnaissance est sans borne. Aurélia, tu es un exemple de pugnacité pour moi. Grandir à tes côtés m'a énormément apporté, et te parler est toujours un plaisir. Je t'embrasse soeurette.

Merci à tous mes amis, d'horizons divers. Ceux d'il y a longtemps : Vélia, Hugo, JB, Camille, Oriane, Jérôme, Romain... Vous dépassez de loin le cadre de ces remerciements. Les colocataires :

Charly, de nombreuses discussions et la foi en la science ont toujours permis d'égayer les soirées de ces premières années de master puis de thèse. Yassine, une des plus belles découvertes amicales de ces dernières années, c'est un plaisir de vivre avec toi, dont les conseils me sont toujours très précieux. Anne-Claire, Anna, Aurélie, Yasmine, le club des doctorants alcooliques constitue toujours une thérapie efficace contre le blues de la blouse. Nida, je suis triste que tu ne puisses pas venir à l'oral, j'espère te revoir bientôt majnoun ! Mehra, merci pour ces 14 mois. Anabelle, si la fin du monde est certaine, avoir de tels amis l'est moins. Tellement d'autres, j'en oublie sans aucun doute dans cette liste : Thomas, Virginie, Beber, Merwan, Ben, Martha, David, Marina, Popo, Cédric, Alexandre, Lucas, Audrey, Lulu, Laura, Vins, Louis, Manon, Carole, ceux de Brighton, Arthur....

Je veux aussi remercier tous les collègues qui ont rendu cette thèse si légère à porter. Benjamin, tu as su dépasser de loin le stade de modèle de rigueur au laboratoire pour devenir un ami. Les stagiaires que j'ai eu le bonheur d'encadrer : Audric, Teng, Na, j'espère vous avoir apporté la moitié de ce que vous m'avez apporté. Tout ce monde faisant l'IBPS et l'IPGG, tous les thésards avec lesquels j'ai pu partager des moments de souffrance et de joie, des bières et des mojitos maison. Sans ordre précis : Sophie, Elia, Camille, Marie-Noëlle, Uz, Sylvia, Eric, Coralie, Fatiha, Claire, Romain, Sarah, Benjamin, Hervé, Arturo, Estefani, Andry, Raphaëlle, Clémence, Anaïs, Julie, Maxime, Bérénice, Hind, Emile, Floriane, Alice, Oriane, Elodie, Charles, Céline, Vanessa, Simon , Elodie, Ismaïl, Radhia, Pauline...

Merci à tous ceux que j'ai oubliés.

Ma vie est plus belle grâce à vous.

Table des matières

Abréviations	11
Introduction	13
I) Contexte global	13
1) Vieillissement de la population et prévalence des maladies neurodégénératives.....	13
2) Rappel rapide sur l'organisation du cerveau.....	13
3) Neurodégénérescence.....	14
4) Agrégation protéique.....	15
5) Un rôle causal de l'agrégation ?.....	16
6) But de la thèse	16
7) Plan de l'introduction.....	18
II) La maladie de Parkinson : de la paralysie agitante aux synucléinopathies	19
1) Symptômes	19
2) Découverte des corps de Lewy.....	20
3) Dopamine et Substantia nigra	21
4) Identification de l'aSyn dans les corps de Lewy et dans des cas familiaux.....	23
5) Facteurs de risque et aSyn.....	24
6) Synucléinopathies.....	25
7) Staging de Braak	27
8) Hypothèse de Braak.....	29
9) Hétérogénéité des patrons d'agrégation.....	29

10) Propagation de l'agrégation à des greffes et hypothèse prion-like	31
III) Amyloïdes.....	32
1) Histoire des amyloïdes	32
2) Caractéristiques des dépôts amyloïdes	32
3) Multimérisation par agrégation seedée.....	34
IV) Maladies à prions : des Prions aux Prionoïdes	39
1) Des maladies génétiques et transmissibles	39
2) Des agents pathogènes non conventionnels	39
3) Prémices de l'hypothèse prion	40
4) Stanley Prusiner et l'hypothèse prion	41
5) Crise de la vache folle	42
6) La PrP.....	43
7) Détection de la PrPsc.....	43
8) Amplification seedée in vitro de la PrPsc.....	44
9) Structure des assemblages de PrPsc	45
10) Rôle de la séquence primaire de la PrP et barrière de transmission	46
11) Propagation intercellulaire de la PrPsc.....	47
12) Souches.....	48
13) Prions non PrP et prionoïdes de type I et II.....	52
Conclusion	53
V) Structures, fonctions et localisations de l'aSyn	54

1) Séquence et structure.....	54
2) Isoformes	55
3) Modifications post-traductionnelles	56
4) Structure de l'aSyn et association aux membranes	59
5) Localisation synaptique.....	60
6) Rôle synaptique	62
7) Localisation nucléaire.....	63
8) Localisation mitochondriale	64
9) Autres fonctions	64
10) Dégradation intracellulaire	64
11) Sécrétion.....	65
VI) Propagation prion-like de l'aSyn	67
1) Agrégation seedée	67
2) Polymorphes.....	69
VII) Etapes d'une propagation prion-like.....	72
1) Initiation de l'agrégation.....	72
2) Propagation de l'agrégation à l'aSyn soluble	74
3) Oligomères	76
4) Propagation dans des modèles animaux transgéniques	77
5) Propagation dans des modèles animaux wild-type.....	78
6) Comparaison des données humaines et provenant des modèles animaux	81

7) Transport axonal.....	82
8) Direction de la propagation	83
9) Tunneling nanotubes	84
10) Sécrétion - Exocytose.....	85
11) Sécrétion - Exosomes	86
12) Interaction de l'aSyn avec des partenaires membranaires	88
13) Internalisation de l'aSyn	89
14) Internalisation de l'aSyn dans les cellules gliales	91
15) Toxicité.....	92
16) Conclusion.....	93
VI) Synapses et propagation de l'agrégation de l'aSyn	94
1) Propagation trans-synaptique de virus.....	95
2) Transport trans-synaptique de tau	95
3) Localisation subcellulaire de l'aSyn et activité synaptique	96
4) Spinules synaptiques	97
5) Un hotspot d'exo/endocytose à la synapse	97
6) Une jonction proche des membranes.....	98
7) Conclusion.....	98
VII) Reconstruction de réseaux de neurones in vitro	99
1) Culture neuronale	99
2) Des micro-cultures autaptiques aux cultures compartimentalisées de neurones.....	100

3) Systèmes de culture microfluidiques.....	101
4) Fabrication des dispositifs microfluidiques.....	103
5) Contrôle du microenvironnement cellulaire et cocultures tridimensionnelles	Erreur ! Signet non défini.
6) Contraindre la pousse axonale dans des microcanaux.....	105
7) Reconstruction de réseaux de neurones pour l'étude de la propagation de l'agrégation : dans la littérature.....	107
8) Contrôle de la topologie des réseaux de neurones par micropatterning.....	108
9) Contrôle de la topologie des réseaux de neurones par des microcanaux asymétriques.....	110
10) Conclusion.....	112
Méthodes	113
Culture cellulaire primaire	113
Systèmes microfluidiques.....	113
Agrégats préformés d'aSyn	113
Immunomarquage & Anticorps	114
Microscopie	115
Analyse d'image automatique.....	115
Détection automatique de somas	115
Western blot.....	115
Résultats	116
Validation de la spécificité d'anticorps anti-pSyn.....	116

Article 1 - Vulnérabilité spécifique de populations neuronales - publication soumise à Scientific Reports	119
Introduction	119
Discussion.....	153
Impact de la vulnérabilité intrinsèque à l'agrégation sur la propagation dans des réseaux de neurones : expériences avec des réseaux de neurones imparfaitement unidirectionnels	154
Article 2 - Développement d'un nouveau système de reconstruction de réseaux de neurones orientés - Publié dans "Methods in Cell Biology" en 2018	159
Introduction	159
Discussion.....	185
Génération de systèmes microfluidiques	186
Article 3 - Modélisation de la propagation prion-like de l'aSyn dans des réseaux de neurones reconstruits 100% orientés - en cours de préparation.....	189
Introduction	189
Discussion.....	217
Discussion	222
Annexes	227
Article annexe 1 - Propagation intercellulaire de la toxine BMAA Neurotoxicity Research 2018 - 5ème auteur	264
Article annexe 2 - Revue sur les mécanismes de propagation intercellulaire des prions - Cellular and Molecular Biology 2018 - 2ème auteur	279

Abréviations

Abeta	Amyloïde beta
ADN	Acide désoxyribonucléique
APLP1	Apolipoprotéine 1
ARN	Acide ribonucléique
aSyn	Alpha-synucléine
BSE	Encéphalopathie spongiforme bovine, <i>Bovine spongiform encephalopathy</i>
CJD	Maladie de Creutzfeldt-Jakob, <i>Creutzfeldt-Jakob Disease</i>
CMA	Autophagie médiée par les protéines chaperonnes, <i>Chaperone Mediated Autophagy</i>
CPEB	<i>Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein</i>
Cter	C-terminal
Cx	Cortex
DLB	Démence à corps de Lewy, <i>Dementia with Lewy Bodies</i>
dMNx	Noyau moteur dorsal du nerf vague X, <i>dorsal motor nucleus of the vagus nerve X</i>
ESSTs	Encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible
GBA	Glucocérébrosidase
GCI	Inclusions cytoplasmiques gliales, <i>Glial Cytoplasmic Inclusions</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GWAS	Etude d'association pangénomique, <i>Genome Wide Association Study</i>
hFib	Fibres d'aSyn humaine
Hip	Hippocampe
Hsp70	<i>Heat shock protein 70</i>
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
HSPG	Héparan sulfate proteoglycans
ILVs	<i>Intraluminal vesicles</i>
KO	<i>Knocked Out</i>
LAG3	<i>Lymphocyte activation gene 3</i>
LBs	<i>Lewy bodies</i>
LN	<i>Lewy neurites</i>
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
LRRTM2	<i>Leucine-rich repeat transmembrane neural protein 2</i>
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
MEA	<i>Micro Electrodes Array</i>
mFib	Fibres d'aSyn murine
MP	Maladie de Parkinson
MPP	1-méthyl-4-phényl-4-propionoxypipéridine

MPT	Modification post-traductionnelle
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MSA	Atrophie multisystémique, <i>Multiple System Atrophy</i>
MVB	<i>Multivesicular body</i>
NACP	<i>Non Amyloid Component Precursor</i>
Nter	N-terminal
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFs	<i>Preformed Fibrils</i>
PID	Protéine Intrinsèquement Désordonnée
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PK	Protéinase K
PMCA	<i>Protein Misfolding Cyclic Amplification assay</i>
PrP	Protéine Prion
PrPc	PrP cellulaire
PrPsc	PrP scrapie
pSyn	aSyn phosphorylée sur la sérine 129
SNC	Système Nerveux Central
SNCA	Gène encodant l'aSyn
SNpc	Substantia nigra pars compacta
Stre	Striatum
TNT	<i>Tunneling Nanotube</i>
TUJ1	<i>Beta-III tubulin</i>
vCJD	variante de la CJD
WT	<i>Wild Type</i>

Introduction

I) Contexte global

1) Vieillessement de la population et prévalence des maladies neurodégénératives

La baisse de la fertilité et l'augmentation de l'espérance de vie provoquent un vieillissement de la population au niveau mondial, appelé à accélérer dans les prochaines décennies. L'âge médian de la population pourrait ainsi passer de 26,6 ans en 2000 à 37,3 ans en 2050 et 45,6 ans en 2100 (Lutz et al., 2008). Ce vieillissement va augmenter la prévalence des pathologies liées à l'âge : cancers, problèmes cardiaques et maladies neurodégénératives vont causer plus de handicaps et de décès que jamais auparavant (Pringsheim et al., 2014). Les maladies neurodégénératives causent des dysfonctions neuronales progressives résultant en des troubles cognitifs et/ou moteurs. De par la longue durée du handicap qu'elles entraînent, elles ont un impact humain et un coût financier particulièrement importants. Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement étiologique pour ces pathologies, car leur développement est complexe et encore mal compris. Le siège de leur développement est en effet un organe dont le fonctionnement reste encore mystérieux : le cerveau. Les essais cliniques des dernières années ont été marqués par des échecs systématiques, ce qui suggère que notre compréhension de ces maladies est encore parcellaire. Il est donc urgent d'améliorer nos connaissances sur leurs mécanismes afin de développer des approches thérapeutiques plus adaptées.

2) Rappel rapide sur l'organisation du cerveau

Le cerveau comprend plusieurs types cellulaires organisés en une architecture tridimensionnelle complexe à micro-, méso- et macro-échelle. Les neurones transmettent l'information sous la forme de signaux électriques et chimiques. Ils ont une organisation extrêmement polarisée qui sous-tend la direction du transfert du signal. Du corps cellulaire, le soma, s'étendent plusieurs prolongements : les dendrites propagent le signal nerveux en sens rétrograde (vers le soma), et l'axone transmet le signal en sens antérograde (depuis le soma) sous la forme d'un potentiel d'action. Le signal nerveux se propage au sein du neurone sous la forme d'une dépolarisation de la membrane, c'est à dire d'un

déséquilibre de charges électriques qui s'autopropage grâce à l'ouverture de canaux ioniques sensibles à la polarisation. Les neurones sont des entités discrètes, qui se transmettent le signal nerveux via des modules spécialisés : les synapses. Celles-ci sont composées de deux parties principales : la présynapse, axonale, convertit le signal électrique en une sécrétion de neurotransmetteurs, tandis que la postsynapse, dendritique ou somatique, possède des récepteurs aux neurotransmetteurs dont l'activation génère une dépolarisation membranaire. Les prolongements neuronaux représentent la majorité du volume des neurones, leur intégrité est donc primordiale pour la fonction neuronale. Il existe de nombreux types de neurones et de synapses, interconnectés en un réseau complexe et hétérogène. Les fonctions cérébrales sont sous-tendues par la topologie de la connectivité synaptique entre les différents types de neurones, qui se modifie en permanence pour intégrer de nouvelles informations. D'autres cellules participent au fonctionnement du cerveau, notamment les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies. Elles permettent le maintien de l'intégrité des neurones, dont l'architecture extrême implique des défis homéostatiques. Elles jouent également un rôle important dans la transmission du signal et la plasticité neuronale. Le cerveau est donc constitué de cellules diverses organisées en une structure dynamique d'une richesse extraordinaire. Les maladies perturbant les fonctions cérébrales représentent donc des défis particuliers, car elles perturbent un système en perpétuel changement dont la fonction repose sur l'interconnexion correcte de ses différents constituants.

3) Neurodégénérescence

Il existe une variété de maladies neurodégénératives, qui sont regroupées selon leurs manifestations cliniques ou neuropathologiques. Cette classification s'affine constamment, et il est maintenant clair qu'il est important de distinguer les sous-types de ces pathologies pour permettre une meilleure compréhension de celles-ci et la formulation de stratégies thérapeutiques plus efficaces (Greenland JC Eur J Neurosci 2019). Les pathologies regroupées sous le terme de maladie d'Alzheimer (MA) sont de loin les plus répandues, et sont caractérisées entre autres par une perte de la mémoire. Celles classées comme maladie de Parkinson (MP) provoquent des troubles du mouvement. Leurs symptômes sont le reflet des régions cérébrales et donc des fonctions qu'elles perturbent. L'hippocampe (Hip) impliqué dans la formation de souvenirs dégénère dans la MA, et la *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) impliquée dans le contrôle moteur dégénère dans la MP. L'apparition

des dysfonctions se fait progressivement. Au niveau de la cellule, la fonction synaptique est d'abord affectée, puis les synapses et les prolongements neuronaux se rétractent, avant que la cellule ne dégénère totalement. Au niveau du cerveau, des régions et populations neuronales précises sont affectées précocement, et de plus en plus d'entre elles le sont au cours du développement de ces pathologies.

4) Agrégation protéique

Le cerveau des patients atteints par des pathologies neurodégénératives contient des dépôts anormaux de protéines agrégées, intra ou extracellulaires, insolubles et résistants à la dégradation. Au niveau moléculaire, ils partagent souvent une organisation typique quasi cristalline en "fibre amyloïde", mais diffèrent par leur composition protéique, leur localisation et leurs propriétés biochimiques de pathologie à pathologie. Par exemple, deux agrégats distincts sont présents dans la MA : les plaques séniles, extracellulaires et composées majoritairement du peptide amyloïde bêta ($A\beta$), et les enchevêtrements neurofibrillaires, intracellulaires et constitués de la protéine tau. Dans la MP, on retrouve des agrégats intraneuronaux composés d'alpha-synucléine (aSyn). Les dépôts somatiques sont appelés corps de Lewy (*Lewy bodies*, LBs) et les dépôts dans les prolongements neuronaux neurites de Lewy (*Lewy neurites*, LNs) (Goedert, 2015). Ces agrégats ne sont pas composés d'un seul type de protéine, ni même seulement de protéines, mais au contraire d'une grande variété de protéines, d'acides nucléiques et de lipides (Galloway et al., 1992; Ginsberg et al., 1998; Shahmoradian et al., 2019b; Spillantini et al., 1997). On les distingue cependant sur la base de leurs composants protéiques principaux, qui y forment les fibres amyloïdes. Ils sont circonscrits à certaines régions et types neuronaux précis, dans lesquels ils se développent séquentiellement suivant un patron conservé (Braak aSyn, Braak tau). On retrouve des agrégats formés de la même protéine dans des pathologies distinctes. L' $A\beta$ forme des agrégats dans la matrice extracellulaire des neurones dans la MA, et dans les capillaires cérébraux dans l'angiopathie amyloïde cérébrale (Goedert and Spillantini, 2006; Johnson et al., 2007). Des agrégats d'aSyn strictement intraneuronaux et cytoplasmiques sont détectés dans la MP (Spillantini et al., 1997), tandis qu'ils sont présents dans les neurones et les cellules gliales dans l'atrophie multisystémique (*multisystemic atrophy*, MSA) (Goedert and Spillantini, 1998; Jellinger and Lantos, 2010; Nishie et al., 2004). Pour compliquer encore la chose, plusieurs agrégats coexistent dans un seul cerveau

pathologique. On détecte en effet dans une partie des patients de la MA, en plus des agrégats d'A β et de tau, des agrégats d'aSyn, et inversement des agrégats de tau chez des patients atteints de la MP (Arai et al., 2001; Arima et al., 1999; Crews et al., 2009; Hamilton, 2000; Lippa et al., 1998).

5) Un rôle causal de l'agrégation ?

Le rôle causal des agrégats fut postulé dès leur détection dans le cerveau des patients au début du XX^{ème} siècle, mais cette hypothèse gagna en force à la fin du siècle, quand fut compris que les protéines constituant les agrégats cérébraux étaient également le siège de mutations causant des formes familiales des pathologies (Goedert et al., 2013; Goedert and Spillantini, 2006). Selon l'hypothèse « prion-like », ces protéines seraient impliquées dans le développement des pathologies neurodégénératives en acquérant une conformation tridimensionnelle anormale. Ce mauvais repliement s'autopropage en se transmettant aux protéines solubles et en provoquant leur agrégation. Les protéines mal repliées peuvent se propager de cellule à cellule, et l'agrégation envahit tissus et organes. Les modalités de la propagation de l'agrégation sont encore mal comprises, bien qu'il soit maintenant établi que nombreux syndromes neurodégénératifs impliquent des processus prion-like (Goedert, 2015).

6) But de la thèse

Mon travail s'est focalisé sur l'hypothèse prion-like dans les synucléinopathies, dont l'exemple le plus étudié est la MP. Cette hypothèse soutient que l'aSyn se propage selon des modalités prion-like dans le système nerveux central (SNC) et périphérique, et que la propagation de cette agrégation sous-tend tout ou partie des symptômes cliniques. L'agrégation de l'aSyn progresse dans le cerveau d'une grande partie des patients en suivant un patron spatio-temporel typique (Heiko Braak et al., 2003). Les facteurs pouvant expliquer ce schéma de progression sont encore incompris. J'ai abordé deux paramètres pouvant expliquer l'établissement de ce patron : la vulnérabilité spécifique de certains neurones à l'agrégation, et l'impact des connexions synaptiques sur la propagation de l'agrégation. Dans ce but, j'ai développé et utilisé de nouveaux systèmes de culture permettant de reconstruire des réseaux de neurones in vitro.

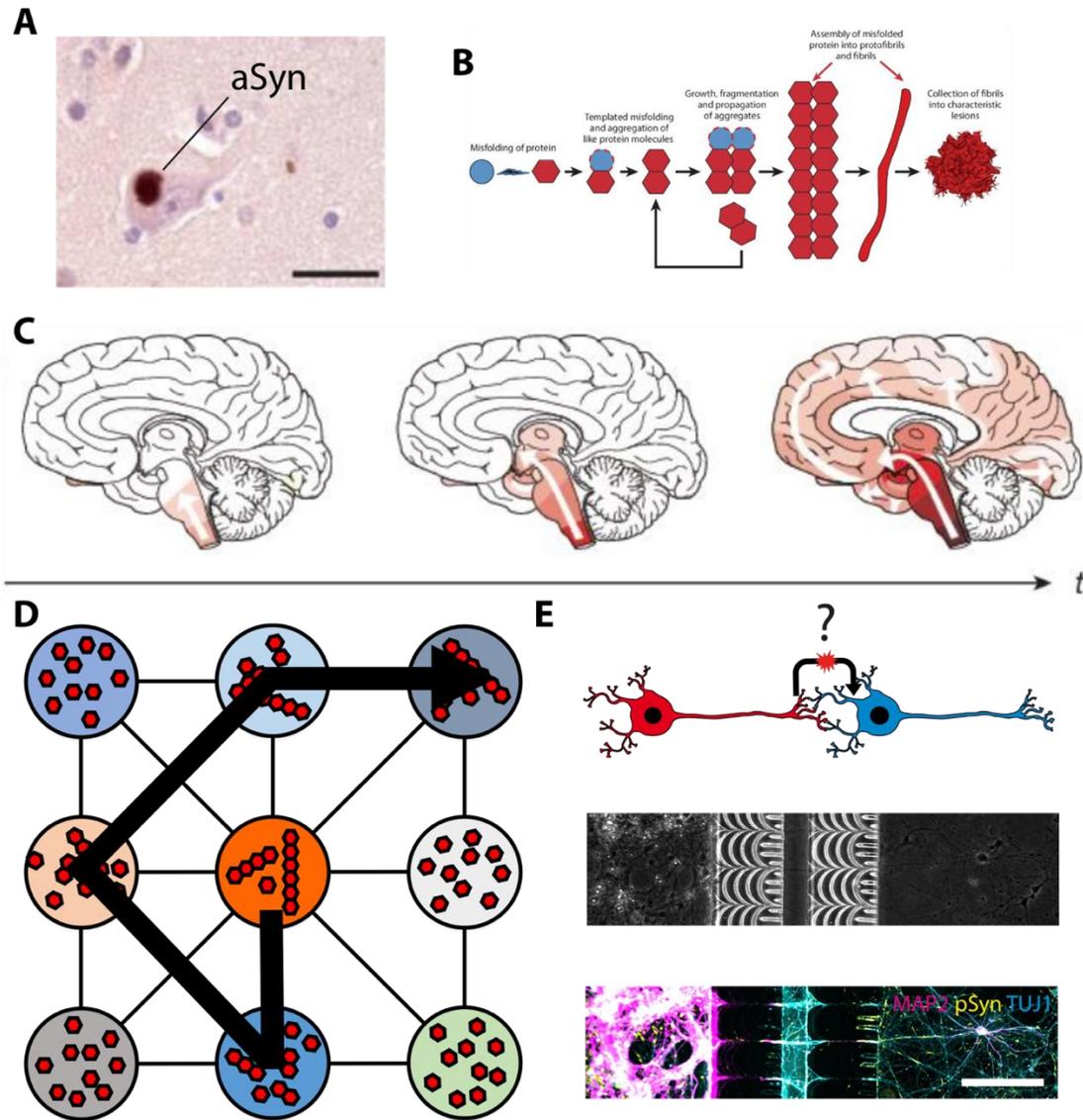


Figure 1 - Résumé de la thèse

(A) L'alpha-synucléine (aSyn) s'aggrège dans les neurones. Barre d'échelle : 20um. (B) Cette agrégation suit un processus de type prion-like, autopropagatif. (C) Les agrégats d'aSyn se développent suivant un schéma conservé dans le cerveau, possiblement en se propageant le long des connexions neuronales. (D) L'agrégation ne se propage pas à toutes les régions interconnectées, ce qui suggère que des paramètres intrinsèques à chaque population influencent la propagation de l'agrégation. (E) Le but de cette thèse a été d'étudier certains de ces paramètres en reconstruisant des réseaux de neurones binaires orientés grâce à des puces microfluidiques dotées de microcanaux asymétriques pour y étudier la propagation prion-like de l'aSyn. Magenta : MAP2 ; Jaune : aSyn phosphorylée ; Cyan : TUJ1. Barre d'échelle : 200um. (A, C) (Jucker and Walker, 2018) (B) (Walker and Jucker, 2015)

7) Plan de l'introduction

Avant d'exposer mes résultats expérimentaux, je restituerai le contexte global qui rend ces expériences importantes. Je ferai tout d'abord un retour historique sur la façon dont la conceptualisation de la MP a évolué, jusqu'à mettre l'aSyn au centre de son étiologie. Afin de mieux comprendre l'hypothèse prion-like qui postule que l'agrégation de l'aSyn se propage par seeding, je ferai un retour sur les modalités d'agrégation seedée des amyloïdes et dans les maladies à prion. Je ferai ensuite un tour d'horizon des comportements physiologiques et pathologiques de l'aSyn, en démontrant que ceux-ci sont compatibles avec l'hypothèse prion-like. J'aborderai ensuite les éléments en rapport avec l'hypothèse d'un passage trans-synaptique de l'agrégation. J'évoquerai ensuite les approches expérimentales impliquant des systèmes de culture microfluidiques de reconstruction de réseaux de neurones *in vitro*, et leur intérêt dans l'étude des mécanismes de transfert interneuronal de l'agrégation de l'aSyn.

II) La maladie de Parkinson : de la paralysie agitante aux synucléinopathies

1) Symptômes

La MP tire son nom de James Parkinson, premier médecin à en fournir une description clinique complète dans son *Essay on the shaking palsy* de 1817. Il y décrit les symptômes de la *paralysie agitante* : "mouvement de tremblement involontaire, accompagné d'une diminution de la force musculaire, dans les membres non sollicités par le mouvement, et cela même quand le patient est supporté. [...] Les sens et l'intellect ne sont pas affectés." Jean-Martin Charcot en fit 50 ans plus tard une description complète dans ses *Leçons sur les maladies du système nerveux*. Il attribue la paternité de la découverte à Parkinson, et contribue à faire connaître cette pathologie.

La MP se déclare généralement après 60 ans, sauf dans certaines formes familiales précoces, et se développe sur plusieurs décennies. Le premier facteur de risque pour la MP est l'âge. C'est principalement une pathologie motrice, caractérisée au niveau moteur par un syndrome parkinsonien : un ralentissement des mouvements associé à au moins l'une des trois manifestations cliniques suivantes : tremblement de repos, rigidité des membres et démarche perturbée (Kalia and Lang, 2015). Plusieurs pathologies distinctes de la MP sont à l'origine de syndromes parkinsoniens, ce qui rend son diagnostic difficile. Ces pathologies dénommées "syndromes parkinsoniens atypiques" sont la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence cortico-basale, l'atrophie multisystématisée (*multisystem atrophy*, MSA) et la démence à corps de Lewy (*dementia with Lewy bodies*, DLB) (Williams and Litvan, 2013). La MP se distingue cependant par la réponse des patients au traitement à la levodopa. On note également une posture physique recroquevillée caractéristique (Jenner et al., 2013). Les symptômes moteurs sont cependant hétérogènes, et l'on distingue deux sous-types majeurs de MP sur leur base : tremblements dominants et tremblements non-dominants. L'évolution pathologique de ces deux sous-types diffère, il se pourrait donc que leur étiologie diffère aussi. Des symptômes non moteurs, les prodromes, apparaissent plusieurs années avant les troubles moteurs : tendance à la dépression, problèmes de constipation, troubles

du sommeil paradoxal et perte de l'odorat. Une démence se développe dans les stades tardifs de la maladie (Kalia and Lang, 2015).

2) Découverte des corps de Lewy

En 1912 Friedrich Lewy, un neurologue allemand travaillant dans le groupe de recherche de Alois Alzheimer, décrit le premier des inclusions dans certaines régions du cerveau de patients atteints par la MP (Goedert et al., 2013). Ces inclusions sont présentes dans les corps neuronaux ainsi que dans leurs neurites, et sont majoritairement composées de protéines (Figure 2A). Il postule alors un lien causal entre ces agrégats et le développement de la pathologie. En 1919, Konstantin Tretiakoff observe ces mêmes inclusions, qu'il nomme alors "corps de Lewy" (*Lewy bodies*, LBs). Il affine la description de leur répartition, et les observe notamment dans la substantia nigra pars compacta (SNpc) (Holdorff, 2019). Après ces observations séminales des LBs et de leur localisation dans diverses régions du cerveau, la recherche sur la MP va se focaliser sur la pathophysiologie des neurones de la SNpc pendant près de 60 ans, au détriment de l'étude des LBs.

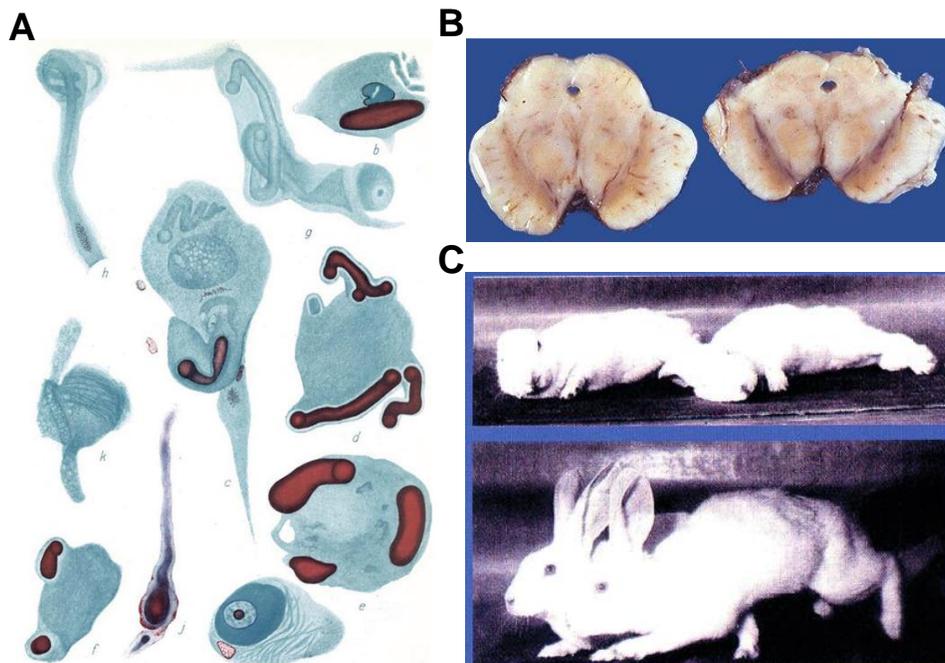


Figure 2 - De la description initiale des corps de Lewy à la découverte de la déplétion en dopamine chez les patients parkinsoniens

(A) Description initiale des corps de Lewy par Friedrich Lewy (Goedert et al., 2013). (B) Comparaison de la Substantia nigra pars compacta (SNpc) chez un individu sain (droite) et un

patient atteints de la maladie de Parkinson (gauche). Une perte des neurones riches en mélatonine de la SNpc est notable chez le patient parkinsonien (contenu récupéré à l'adresse URL suivante le 23/07/2019 : <https://webpath.med.utah.edu/CNSHTML/CNS102.html>). (C) Effets antagonistes de la réserpine (haut) et de la lévodopa (bas) sur la motricité de lapins (Carlsson, 1971).

3) Dopamine et Substantia nigra

Tretiakoff avait noté une perte marquée des neurones dans la SNpc, et avait proposé un lien entre perte neuronale dans cette région et symptômes moteurs (Fig 2B). En effet, Blocq et Marinesco avait décrit en 1893 le cas d'un patient atteint d'une tumeur localisée dans la SNpc et présentant des syndromes parkinsoniens (Hostiuc et al., 2016). Rolf Hassler confirma la perte des neurones dans cette région et en affina la description (Holdorff, 2019). Les travaux d'Arvid Carlsson permirent d'éclaircir le lien entre dégénérescence de la SNpc et troubles moteurs. Il démontra que la dopamine est un neurotransmetteur (Carlsson et al., 1958; Montagu, 1957), dont le niveau pouvait être diminué par l'injection de réserpine et rétabli par l'injection de levodopa. A la même période, deux équipes décrivent que 80% de la dopamine est localisée dans le striatum, et lui postulent un rôle dans le contrôle du mouvement (Bertler and Rosengren, 1959; Sano et al., 1959)(Bertler and Rosengren 1959 *Experientia*, Sano BBA 1959). Arvid Carlsson propose alors que la déplétion de la dopamine dans le striatum provoque les troubles moteurs de la maladie de Parkinson. Cette hypothèse découle 1) de la localisation de la dopamine dans le circuit des ganglions de la base, centraux dans le contrôle du mouvement, et 2) de l'effet de la réserpine. Cette molécule provoque en effet dans plusieurs modèles animaux, dont les lapins, des symptômes très proches de ceux observés chez les patients parkinsoniens en vidant les stocks de dopamine par l'inhibition de sa recapture à la fente synaptique. La levodopa, un précurseur de la dopamine et de la noradrénaline capable de traverser la barrière hématoencéphalique, permettait de rétablir les fonctions motrices après administration de réserpine (Carlsson, 1993, 1971) (Fig 2C). En 1960, Ehringer et Hornykiewicz observent une forte diminution du niveau de dopamine dans le cerveau de 6 patients ayant souffert de la MP et de syndromes parkinsoniens post-encéphaliques (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Plusieurs équipes localisées en Allemagne, au Canada et au Japon répliquèrent ces résultats. Hornykiewicz mena alors un essai clinique d'administration de levodopa chez des patients parkinsoniens, avec des effets positifs spectaculaires (Birkmayer and Hornykiewicz, 1961). De nouvelles méthodes histochimiques permettent de déterminer que les

neurones responsables de l'innervation dopaminergique se trouvent dans la SNpc, établissant un lien entre la dégénérescence de cette région et les troubles moteurs liés à la perte de la dopamine (Dahlstroem et al., 1964). Les travaux de George Cotzias permettent d'améliorer le dosage et la fréquence du traitement à la levodopa et de traiter régulièrement les patients (Cotzias et al., 1967). L'efficacité spectaculaire de ce traitement est décrite par Oliver Sacks dans son livre "Awakenings" de 1973, adapté en un très beau film du même nom en 1990. La levodopa n'a malheureusement qu'une efficacité limitée dans le temps chez les parkinsoniens post encéphaliques, mais également chez les autres patients parkinsoniens, pouvant même aboutir à une aggravation de certains symptômes moteurs sur le long terme (Fabbrini et al., 2007). En 1982, des patients ayant procédé à une administration accidentelle de MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine) développent subitement des troubles parkinsoniens avancés, associés à une dégénérescence de la SNpc. Ces accidents tragiques résultent de l'injection d'un lot mal synthétisé de l'opiacé MPPP (1-méthyl-4-phényl-4-propionoxypipéridine) (Langston et al., 1983; Marsden, 1982). Ces observations mènent à l'hypothèse que la MP pourrait avoir une cause environnementale provoquant la dégénérescence sélective de la SNpc. Les effets du MPTP chez l'humain ayant été caractérisés suite à cet épisode, l'injection de cette molécule chez plusieurs animaux de laboratoires (Braungart et al., 2004; Heikkila et al., 1984; Wang et al., 2007) est devenu un modèle utile pour l'étude de la MP et de la dégénérescence sélective de la SNpc. L'étude du mécanisme d'action du MPTP permet de mettre en lumière l'importance de la biologie mitochondriale et du stress oxydant lié au métabolisme de la dopamine dans la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques. Le MPTP, qui est liposoluble, franchit la BHE et est sélectivement transféré dans les neurones dopaminergiques via les transporteurs à la dopamine. Les effets toxiques sont causés par un métabolite du MPTP, le MPP⁺, qui est un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ramsay et al., 1986), et provoque un important stress oxydatif ainsi qu'une redistribution de la dopamine depuis ses sites de stockages vésiculaires vers le cytosol (Lotharius and Brundin, 2002). Par la suite, l'étude de plusieurs formes génétiques de la MP, par exemple celles causées par des mutations dans les gènes *PINK1* ou *PARK2* confirma l'importance des dysfonctions mitochondriales et des mécanismes autophagiques et mitophagiques dans la pathogénèse de la MP (Thomas and Beal, 2007). Outre le métabolisme de la dopamine, la vulnérabilité particulière des neurones dopaminergiques à ces dysfonctions résulterait de leur

physiologie particulière. Ceux-ci ont en effet une arborescence axonale très développée et une importante activité basale, ce qui rend les rend particulièrement vulnérables à des perturbations du métabolisme énergétique, de la dynamique mitochondriale et du stress oxydant (Surmeier et al., 2017).

La mort des neurones de la SNpc induisant une déplétion de la dopamine striatale est depuis fermement établie comme un élément central du développement de la MP. Elle permet d'expliquer les syndromes parkinsoniens par un déficit en dopamine dans le circuit des ganglions de la base, central dans le contrôle moteur. La vision nigrocentriste a permis de développer plusieurs approches thérapeutiques efficaces, ce qui à ma connaissance fait de la MP une exception parmi les maladies neurodégénératives. En effet, en sus des traitements à la levodopa, des greffes de neurones dopaminergiques fœtaux (Lindvall et al., 1990) et des techniques de neurostimulation profonde (Benabid et al., 1987) ont permis d'améliorer les symptômes parkinsoniens. Cependant, d'autres symptômes, moteurs ou non, ne sont pas modifiés par ces traitements, et la pathologie continue à se développer malgré ceux-ci (Kalia and Lang, 2015). Cette observation peut indiquer que la mort des neurones dopaminergiques de la SNpc a des effets profonds sur la plasticité cérébrale, provoquant des dysfonctions progressives dans des zones distantes, ou encore qu'il existe d'autres événements causaux dans la MP, en amont ou en parallèle de cette dégénérescence. L'hypothèse prion-like postule que l'agrégation de l'aSyn, le constituant principal des LBs, constitue l'un de ces événements causaux non modifié par les stratégies thérapeutiques évoquées précédemment. Mon travail de thèse s'est focalisé sur cet aspect de l'étiologie de la MP, et la séquence introductive de mon manuscrit se concentrera donc sur celui-ci.

4) Identification de l'aSyn dans les corps de Lewy et dans des cas familiaux

Quelques avancées sur les LBs ont eu lieu pendant le XXème siècle, mais leur biologie est globalement restée en marge des scénarios expliquant l'étiologie de la MP. L'étude de leur morphologie en microscopie électronique révèle qu'ils contiennent des fibres sensiblement similaires aux fibres amyloïdes identifiées précédemment dans d'autres pathologies à agrégats protéiques (Cohen and Calkins, 1959; Duffy and Tennyson, 1965). On découvre aussi qu'ils sont

excessivement ubiquitinylés (Kuzuhara et al., 1988). Il faut cependant attendre la fin des années 90 pour que soit découvert leur composant majeur : l'alpha-synucléine (aSyn) (Spillantini et al., 1997).

Cette protéine avait précédemment été identifiée dans d'autres contextes. En 1988, Luc Maroteaux l'identifie dans le poisson torpille, et la nomme synucléine, d'après sa localisation synaptique et nucléaire (Maroteaux et al., 1988). En 1993, l'équipe de Tsunao Saitoh identifie et séquence partiellement l'un des composants des plaques séniles de la MA, qu'elle nomme "non-Abeta-component precursor" (NACP) (Uéda et al., 1993). A la même période, Ross Jakes, Maria Spillantini et Michel Goedert notent que des anticorps dirigés contre la protéine tau reconnaissent également deux autres protéines dans des extraits de tissus neuronaux humains. Après avoir purifié et séquencé celles-ci, ils les nomment Perfectin et Imperfectin (Jakes et al., 1994). Plus tard, ils s'aperçoivent de la similarité de la Perfectin avec le NACP et la synucléine, et décident de renommer les protéines qu'ils avaient identifiées alpha-synucléine et beta-synucléine. La famille des synucléines chez l'humain se retrouve bientôt au complet avec la découverte de la gamma-synucléine (Ji et al., 1997).

En 1997, deux publications majeures provoquent un changement de paradigme dans l'étude de la MP. En juin, la première mutation liée à une forme familiale de la MP est décrite dans quatre familles différentes. Cette mutation est localisée dans le gène *SNCA* encodant l'aSyn, et provoque une forme autosomale dominante de la maladie de Parkinson (Polymeropoulos et al., 1997). Suite à cette découverte, l'équipe de Goedert observe que les LBs sont fortement et spécifiquement marqués par deux anticorps ciblant les régions C et N terminales (Cter, Nter) de l'aSyn. Ils publient leurs résultats en août 1997 (Spillantini et al., 1997). Depuis, de nombreux éléments ont établi que l'aSyn était un acteur majeur dans l'étiologie de la MP.

5) Facteurs de risque et aSyn

Bien qu'elles représentent un faible pourcentage (5 à 10%) des cas de MP, les formes génétiques de cette pathologie nous donnent des éléments de compréhension pour les formes non génétiques (sporadiques). De nombreuses mutations ponctuelles dans *SNCA* (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E, A53T) ainsi que la duplication ou la triplication de son locus causent des formes familiales de MP (Ferese et al., 2015; Ibáñez et al., 2004; Kiely et al., 2013; Krüger et al., 1998; Pasanen et al., 2014;

Polymeropoulos et al., 1997; Proukakis et al., 2013; Singleton et al., 2003; Zarranz et al., 2004). L'aSyn recombinante forme des agrégats amyloïdes, dont la structure nanométrique est similaire à celle observée dans les LBs (Duffy and Tennyson, 1965; Serpell et al., 2000). Qui plus est, 95% des patients de la MP présentent des LBs et des LNs (Goedert, 2015). La MP a des facteurs de risques génétiques hors du locus de *SNCA*, mais les effets de ceux-ci semblent liés à l'aSyn d'une façon ou d'une autre. Les causes génétiques les plus communes de la MP sont des mutations dans *GBA*, qui code la beta-glucocérébrosidase, une enzyme lysosomale, dans *PINK1*, dont le transcrit est une kinase mitochondriale, ou dans *LRRK2*, qui code une kinase impliquée dans le contrôle du trafic vésiculaire (Cookson, 2016; Gan-Or et al., 2018; Kalia and Lang, 2015; Kitagishi et al., 2017). Cependant, les mutations pathologiques de ces gènes, leur perte de fonction ou la diminution de leur expression sont associées à l'agrégation de l'aSyn, putativement en altérant sa dégradation (Creed and Goldberg, 2018; Du et al., 2015; Islam and Moore, 2017). De nombreux autres loci ont été associés à une élévation du risque de développer la MP. La MP a également des facteurs de risque environnementaux, dont l'exposition à certains métaux ou à des pesticides (Kalia and Lang, 2015; Rokad et al., 2017). Or, si l'action des pesticides implique une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Betarbet et al., 2000), ils induisent également l'agrégation de l'aSyn (Uversky et al., 2001a), et l'expression de l'aSyn module la toxicité de la roténone (Zharikov et al., 2015). Les métaux accélèrent directement l'agrégation de l'aSyn (Uversky et al., 2001b). Cependant, il faut noter que certains patients présentant la mutation pathologique de *LRRK2* G2019S n'ont pas de LBs détectables dans leurs tissus neuronaux, mais présentent d'autres agrégats non réactifs pour l'aSyn (Cookson et al., 2008; Gaig et al., 2007). Il est cependant possible que des agrégats d'aSyn non détectables par les méthodes conventionnelles soient présents chez ces patients (Roberts et al., 2015). La pénétrance de cette mutation est cependant faible, ce qui indique une interaction de facteurs génétiques et environnementaux (Bonifati, 2007; Kay et al., 2005; Rokad et al., 2017). Ainsi, dans la plupart des formes de MP, les facteurs de risques convergent vers l'aSyn.

6) Synucléinopathies

On détecte des agrégats d'aSyn dans de très nombreuses pathologies, collectivement dénommées *synucléinopathies* : la démence à corps de Lewy (*Dementia with Lewy bodies*, DLB), la neurodégénérescence avec surcharge cérébrale en fer de type I, la variante à corps de Lewy de la

MA, la MSA, dans laquelle l'aSyn forme les corps de Papp-Lantos ou inclusions cytoplasmiques gliales (*glial cytoplasmic inclusions*, GCIs), la maladie de Gaucher, l'hypotension orthostatique idiopathique (*pure autonomic failure*), et les syndromes de Kufor-Rakeb, de Chediak-Higashi ou encore de Sanfilippo (Arawaka et al., 1998; Baba et al., 1998; Espay et al., 2019; Gai et al., 1998; Goedert and Spillantini, 1998). La prévalence de ces pathologies est difficile à estimer, mais reste bien inférieure à celle de la MP. La DLB est sous-diagnostiquée, en partie car elle survient souvent de façon mixte avec la MA (Outeiro et al., 2019). On détecte en effet des LBs dans la moitié des cas de MA (Brenowitz et al., 2017). Cette ubiquité des agrégats d'aSyn associée à l'échec des thérapies anti-amyloïdes pour combattre la MA a mené certains auteurs à remettre en question la nature causale de l'agrégation protéique dans les syndromes neurodégénératifs, et plus précisément de celle de l'aSyn dans la progression de la MP (Espay et al., 2019). Qui plus est, la sévérité des symptômes observés dans la MP corrèle mal avec la quantité de LBs détectés (Parkkinen et al., 2008). Les auteurs suggèrent donc que dans certains cas, l'agrégation de l'aSyn pourrait être déclenchée par un contexte pathologique, et ne représenterait alors qu'un épiphénomène. Cependant, l'agrégation de l'aSyn est un phénomène complexe, qui génère d'autres espèces que les agrégats amyloïdes présents dans les LBs et visés par les stratégies d'immunothérapie. Ces oligomères, dont nous évoquerons plus loin la biologie, sont moins aisés à détecter que les amyloïdes et auraient un impact fonctionnel plus sévère.

Une partie des facteurs de risques génétiques de la MP, tels que des mutations dans *SNCA* et *GBA*, sont également des facteurs de risque pour la MSA (Sklerov et al., 2016). Comme la MP, cette pathologie est associée à la présence d'inclusions filamenteuses d'aSyn (Goedert and Spillantini, 1998). Les symptômes de cette pathologie diffèrent partiellement de la MP, le tableau clinique de la MSA contenant en plus de symptômes parkinsoniens des dysfonctions du cervelet et du système nerveux autonome, reflétant une dégénérescence la SNpc et du noyau olivo-ponto-cérébelleux (Valera and Masliah, 2018). On distingue deux sous-types de MSA selon la prédominance des symptômes parkinsoniens ou cérébelleux. Une autre différence notable est l'agressivité de la MSA, les patients ayant typiquement besoin d'une chaise roulante 5 ans après la déclaration des symptômes moteurs (Gilman et al., 2008). La répartition des inclusions d'aSyn diffère également : des inclusions neuronales sont présentes dans diverses régions cérébrales dès les premiers stades

de la pathologie (Cykowski et al., 2015), et des inclusions typiques de la MSA sont détectées dans les oligodendrocytes. La source de l'aSyn oligodendrocytaire est encore obscure, ces cellules exprimant l'aSyn à de faibles niveaux physiologiques (Valera and Masliah, 2018). D'autres éléments expérimentaux forts supportent que l'agrégation de l'aSyn soit un évènement important dans la pathogénèse de la MSA (Watts et al., 2013; Woerman et al., 2019). Les données sur cette pathologie restent cependant limitées, environ 0,004% de la population étant atteinte par celle-ci (Fanciulli and Wenning, 2015). En comparaison, la MP est diagnostiquée chaque année chez 0,1 à 0,2% de la population mondiale et touche près de 1% des plus de 60 ans (de Lau and Breteler, 2006; von Campenhausen et al., 2005). La plupart des données sur l'agrégation de l'aSyn chez l'humain proviennent donc de l'étude de la MP.

Le rôle causal de l'agrégation protéique dans les pathologies neurodégénératives est théorisé depuis de nombreuses années (Caughey and Lansbury, 2003; Dobson, 1999) (Caughey 2003, Dobson TIBS 1999). Cependant, la fréquence de la présence d'agrégats d'aSyn dans des pathologies neurodégénératives aux symptômes distincts a mené certains auteurs à mettre en doute que l'agrégation protéique soit invariablement causale. Deux observations majeures ont supporté plus directement un rôle central de l'agrégation de l'aSyn dans la pathogénèse de la MP, et donné une explication mécanistique à la progression concomitante de l'agrégation et des symptômes : le développement séquentiel de l'agrégation le long des voies neuroanatomiques, et la détection de LBs dans des greffes neuronales chez des patients parkinsoniens.

7) Staging de Braak

L'utilisation d'anticorps dirigés contre l'aSyn a permis de détecter les LBs dans les cerveaux des patients de façon bien plus efficace que les méthodes de marquage précédentes, qui reposaient sur la détection immunologique de l'ubiquitination. Les LBs ainsi marqués sont présents dans de nombreuses régions en plus de celles initialement décrites par Lewy et Tretiakoff, et semblent apparaître de façon progressive dans des régions de plus en plus nombreuses. Braak et collègues établissent au début des années 2000 une description systématique de la répartition des LBs dans des cerveaux post-mortem d'une série de patients atteints de MP sporadique à divers stades de développement de la pathologie, ainsi que de patients sains. Cette étude révèle un schéma

spatiotemporel conservé d'apparition des LBs dans le SNC, divisé en stades I à VI, qu'on appelle maintenant le "staging" (scénario) de Braak (Fig 3). Les auteurs notent une implication graduelle de diverses régions au cours du développement de la pathologie, et des LBs sont détectés chez des patients sans diagnostic de MP, dans les régions inférieures du tronc cérébral et du bulbe olfactif. Les auteurs proposent que ces patients étaient dans une phase présymptomatique de la MP, et les classent dans les stades I à II correspondant aux stades prodromaux de la pathologie. Les fonctions des régions atteintes dans les stades I et II sont en effet liées aux prodromes de la MP : anosmie, troubles digestifs, troubles du sommeil paradoxal. Le stade I est caractérisé par la présence de LBs entre autres dans le noyau dorsal moteur du nerf vague (*dorsal IX/X motor nucleus, dMNx*) et le bulbe olfactif. La pathologie s'étend ensuite dans le stade II au locus coeruleus, au noyau giganto-cellulaire et aux noyaux médullaires du raphé. La SNpc est atteinte au stade III, ainsi que le système limbique et le prosencéphale basal. La pathologie s'étend ensuite de façon plus diffuse lors des stades IV à VI aux régions corticales (Heiko Braak et al., 2003; Braak et al., 2004). Les auteurs remarquent que des régions associées au contrôle moteur autres que la SNpc sont touchées. Ces observations séminales sont extrêmement importantes pour la compréhension de la MP : en plus de supporter l'implication d'autres régions que la SNpc dans la pathologie, elles mettent en évidence une progression de l'agrégation selon un patron conservé. Cependant, les mécanismes à la base du staging de Braak restent mal compris.

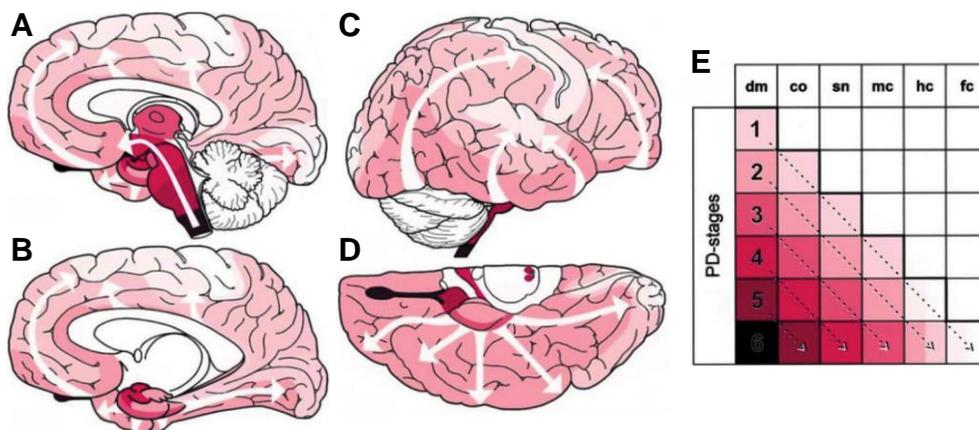


Figure 3 - Staging de Braak

(A-D) Illustration de l'apparition progressive des LBs dans le SNC. Les régions les plus sombres correspondent à celles atteintes le plus précocement : dMNx et bulbe olfactif. (E) Résumé des différentes étapes du staging de Braak. dm:dMNx; co:Complexe du coruleus-subcoruleus ; sn:substantia nigra ; mc:mesocortex anteromedial temporal ; hc:aires d'association sensorielle de

haut niveau et régions préfrontales ; fibres d'association sensorielle de premier ordre, aires prémotrices, régions sensorielles primaires et régions motrices. Illustrations extraites de Braak et al 2003.

8) Hypothèse de Braak

Parmi les régions précocement touchées, on trouve le dMNX situé dans le tronc cérébral, et le bulbe olfactif à l'extrémité rostrale du SNC (Beach et al., 2009; Jellinger, 1991). Ces régions envoient des projections non myélinisées vers la périphérie, respectivement vers l'épithélium intestinal et l'épithélium olfactif. Or comme le notent Hawkes et collègues, les virus neurotropes sont souvent internalisés aux synapses (Card, 1998), et les neurones non myélinisés et innervant la périphérie sont particulièrement sensibles à de telles infections. Ils proposent donc qu'un agent pathogène non identifié, possiblement viral, gagne accès au système nerveux central avant de se propager dans les réseaux de neurones (H. Braak et al., 2003; Hawkes et al., 2007). En effet, le patron de développement peut être partiellement lié au patron de connections antérogrades depuis le bulbe olfactif, et rétrogrades depuis le dMNX. De nombreux virus peuvent envahir le cerveau via le nerf vague, dont le virus HSV-1 qui présente un patron d'invasion similaire à celui des LBs. Cependant, la lenteur avec laquelle les LBs envahissent le cerveau, sur plusieurs décennies, distingue ce phénomène des infections virales connues. Des LBs sont effectivement détectables dans le système nerveux entérique (SNE) (Braak et al., 2006; Shannon et al., 2012; Wakabayashi et al., 1990). Des LBs ont également été observés dans d'autres sites périphériques, tels que le côlon ou l'appendice (Killinger et al., 2018; Lebouvier et al., 2010). La présence d'inclusions d'aSyn a également été mise en évidence dans des biopsies périphériques 20 ans avant la déclaration de syndromes parkinsoniens (Murphy et al., 2018). Le scénario d'une invasion du SNC par la périphérie est donc supporté par de nombreuses observations.

9) Hétérogénéité des patrons d'agrégation

Cependant, un pourcentage conséquent des patients présentant des LBs ne suivent pas le staging de Braak, mais présentent une répartition focale atypique des LBs, avec par exemple des inclusions dans le locus coeruleus mais pas dans le dMNX (Louis et al., 2005), ou encore une implication préférentielle du cortex (Yokota et al., 2007). Certains patients présentent des LBs dans le SNC sans qu'on puisse en détecter en périphérie, remettant en cause l'origine périphérique du phénomène

(Adler and Beach, 2016; Beach et al., 2010). Il existe d'autres systèmes de classification de l'apparition des LBs que le staging de Braak. Le staging de McKeith permet de confirmer en post-mortem un diagnostic de DLB (McKeith et al., 2005). Un autre système basé sur l'observation post-mortem de la répartition des inclusions d'aSyn permet également de classer les patients atteints de MSA à différents stades de la pathologie (Jellinger et al., 2005). L'incidence des cas atypiques ne suivant pas ces systèmes varie selon les études, 17 à 47% des patients examinés post-mortem ne suivant pas le staging de Braak (Attems and Jellinger, 2008; Kalaitzakis et al., 2008), et jusqu'à 18.3% ne suivent ni le système de Braak ni celui de McKeith (Parkkinen *L acta neuropathol* 2008). Le staging de Braak permet tout de même de prédire la propagation de l'agrégation chez une part non négligeable des patients atteints par la MP, surtout ceux à déclenchement précoce de la pathologie et progression lente (Rietdijk et al., 2017).

Qui plus est, la corrélation entre mort neuronale et développement des LBs reste incertaine. En effet, certains patients dont la quantité d'inclusions les classe dans les stades V à VI ne présentent pas de syndromes parkinsoniens (Jellinger, 2009; Parkkinen et al., 2008) (Parkkinen 2008, Jellinger 2009), cependant que certains patients ayant reçu un diagnostic de MP n'ont qu'une quantité très modérée de LBs, voire pas du tout dans certaines formes familiales (Cookson et al., 2008; Gaig et al., 2007; Johansen et al., 2018). Qui plus est, les LBs sont présents chez de nombreux patients asymptomatiques (Frigerio et al., 2011; Parkkinen et al., 2005), et la quantité de LBs est faiblement corrélée aux symptômes (Parkkinen et al., 2008). Ces éléments suggèrent que des facteurs distincts gouvernent la magnitude de l'agrégation et la toxicité cellulaire que celle-ci engendre.

Ainsi, l'apparition des inclusions d'aSyn dans le SNC suit des logiques distinctes dans des sous-groupes de patients, et l'impact fonctionnel de ces inclusions diffère de patient à patient. Il est tout de même remarquable que le développement des LBs chez une partie non négligeable des patients puisse être classifié selon des systèmes comme le staging de Braak, qui suggère l'invasion du cerveau par un agent pathogène suivant les connexions neuroanatomiques. Quel pourrait alors être cet agent pathogène ?

10) Propagation de l'agrégation à des greffes et hypothèse prion-like

En 2008, on détecte des LBs dans des greffons de neurones fœtaux dopaminergiques chez des patients parkinsoniens (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008a; Mendez et al., 2008) (3 Nat Med 2008 : Li JY, Kordower JH, Mendez D). L'apparition de ces LBs est progressive (Chu and Kordower, 2010) et n'est détectée que dans une sous-partie des patients. Alternativement aux explications mettant en jeu une toxicité de l'environnement du greffon, *via* par exemple des mécanismes inflammatoires ou une excito-toxicité, une hypothèse provocatrice est que la propagation de l'agrégation au greffon se fasse selon des mécanismes prion-like (Brundin et al., 2008). Selon ce scénario, les agrégats d'aSyn peuvent catalyser l'agrégation de l'aSyn soluble et peuvent être transférés de cellules malades à cellules naïves, y propageant l'agrégation. Cette hypothèse s'inspire de l'étiologie des maladies à prions, et de l'observation que l'injection dans des souris mutantes pour l'APP d'agrégats provenant de patients atteints de MA ou d'extraits de cerveaux de souris mutantes âgées déclenche le développement de plaques amyloïdes (Meyer-Luehmann et al., 2006). Ces données sont les premières à supporter l'hypothèse prion-like. On peut tout de même noter qu'elle avait été évoquée dans certains articles antérieurs pour expliquer la lenteur extrême avec laquelle les lésions se propagent (H. Braak et al., 2003; Braak and Del Tredici, 2008), ou les formes familiales liées au dosage de l'aSyn (Hardy, 2005). La propagation d'aSyn d'un hôte à des cellules greffées fut répliquée dans des souris surexprimant l'aSyn (Hansen et al., 2011) ou dans des rats surexprimant l'aSyn (Angot et al., 2012), supportant l'hypothèse prion-like.

L'aSyn recombinante peut s'agréger en adoptant une géométrie dite "amyloïde", bien que d'autres conformations multimériques puissent être obtenues (Bousset et al., 2013a; Serpell et al., 2000), et il a été proposé que la propagation de cette agrégation entre neurones se fasse selon des modalités "prion-like". Que recouvrent ces deux termes et que nous apprennent-ils sur les potentielles bases moléculaires des synucléinopathies ?

III) Amyloïdes

1) Histoire des amyloïdes

Les agrégats protéiques que l'on retrouve dans le cerveau des patients dans de nombreuses pathologies neurodégénératives ont une structure amyloïde, caractérisée par un certain arrangement géométrique des protéines et une capacité à fixer spécifiquement certains colorants. Le terme "amyloïde" tire son origine de l'observation de dépôts dans les tissus cérébraux de patients par Rudolph Virchow en 1854. Ces dépôts étant marqués par l'iode, connue pour colorer l'amidon, celui-ci fut convaincu qu'ils étaient eux-mêmes composés d'amidon, d'où le terme « amyloïde » (Virchow, 1863). Malgré la découverte en 1859 de la composition albumoïde de ces dépôts, et de l'absence totale d'amidon en leur sein, le terme persista. Pour cela, il fut comparé à Colomb qui cherchant l'Inde découvrit les Amériques, dont les autochtones sont encore appelés indiens. Une des raisons possibles de cette persistance sur la longue durée est que l'iode, grâce à ses capacités métachromatiques, a longtemps été le colorant de préférence pour visualiser les dépôts amyloïdes. Un colorant métachromatique change de couleur quand il se lie à certaines molécules. L'iode permit de mettre en évidence la présence de ces dépôts dans de nombreuses pathologies. On découvrit ensuite d'autres colorants métachromatiques plus spécifiques des amyloïdes, tels que le méthyl violet et le rouge du Congo.

2) Caractéristiques des dépôts amyloïdes

Le rouge du Congo se fixe de façon très spécifique aux dépôts amyloïdes, notamment dans les sections de tissus congelés ou sous paraffine (Yakupova et al., 2019). Sous lumière polarisée, celui-ci présente par biréfringence une couleur vert pomme quand lié à des dépôts amyloïdes (Yakupova et al., 2019) (Fig 4C). Une autre des caractéristiques distinctives des dépôts amyloïdes est leur patron de diffraction aux rayons X, observé pour la première fois par William Astbury en 1935 suivant la dénaturation de protéines par la chaleur. Il nota que la diffraction générait deux bandes orthogonales, et en déduisit que les protéines étaient empilées les unes sur les autres, en une structure plus tard connue sous le nom de feuillets beta, et que les filins formés de feuillets beta étaient eux-mêmes arrangés en paires (Fig 4A et 4B) (Astbury et al., 1935). Plus tard, Pauling et

Corey créèrent un modèle de formation des feuillets beta reposant sur des liaisons hydrogène entre les protéines. Dans ce modèle, les liaisons hydrogène se forment entre les groupements amides du squelette des protéines (Pauling and Corey, 1951). L'utilisation de la diffraction aux rayons X sur des fibres amyloïdes isolées d'agrégats pathologiques généra le même schéma que celui décrit par Astbury plus tôt, indiquant que leur structure tridimensionnelle était similaire. Ce patron de diffraction et la structure qu'il révèle sont collectivement dénommés structure croisée bêta (*cross beta diffraction pattern*) (Cohen and Calkins, 1959; Eanes and Glenner, 1968). La biréfringence verte en présence de rouge Congo et la structure croisée bêta en diffraction aux rayons X sont les observables permettant d'affirmer la nature amyloïde d'un agrégat (Jahn et al., 2010) (Fig 4). Malgré leur forte ressemblance structurelle et l'affinité pour les mêmes colorants, les agrégats amyloïdes peuvent être constitués de protéines aux séquences primaires variées (Glenner et al., 1971; Jahn et al., 2010).

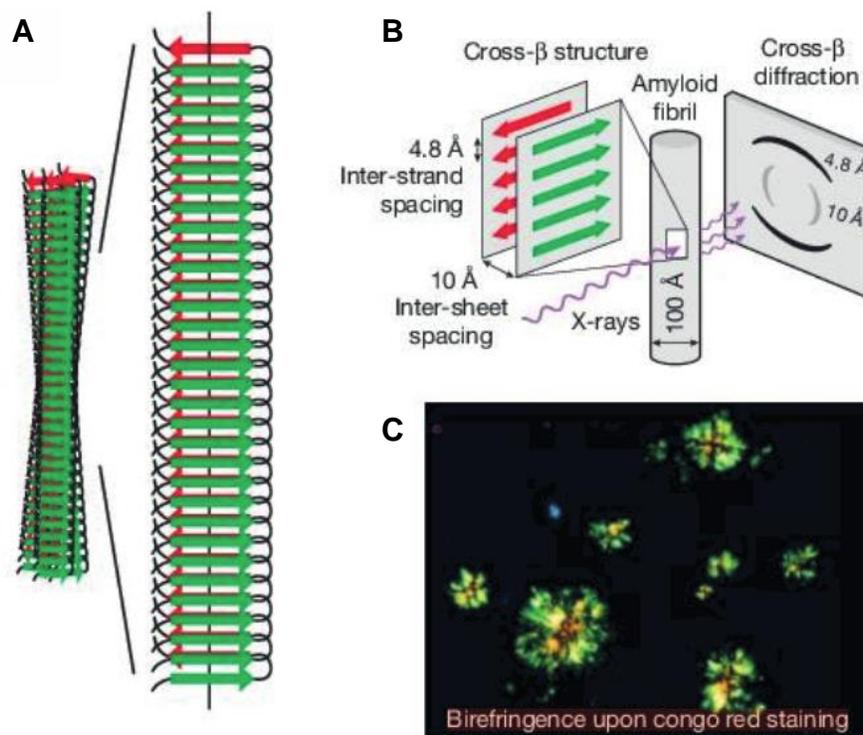


Figure 4 - Propriétés des fibres amyloïdes

(A) Les fibres amyloïdes sont composées de protéines empilées en feuillets beta. (B) L'exposition de fibres amyloïdes aux rayons X génère un patron de diffraction révélant les dimensions caractéristiques de la fibre : l'espacement entre de 10Å les deux filins et de 4.8Å entre chacun des feuillets beta. (C) La coloration de dépôts amyloïdes au rouge du Congo génère en lumière polarisée une biréfringence dans le vert. (Jucker and Walker, 2013)

3) Multimérisation par agrégation seedée

L'agrégation des protéines en fibres amyloïdes suit un scénario de nucléation-élongation-fragmentation (Jarrett and Lansbury, 1993). Dans certaines conditions exposant des résidus normalement enfouis au cœur de la protéine, par exemple une dénaturation ou une mauvaise prise en charge de la protéine par les chaperonnes pendant la traduction (Chiti et al., 1999; Wang et al., 2008), plusieurs protéines s'agglutinent de façon non cristalline. On parle alors de nucléation primaire. Par la suite, ce noyau initial subit un réarrangement interne jusqu'à atteindre une structure énergiquement très stable : l'amyloïde (Auer et al., 2008). La nature du noyau primaire à la base du processus agrégatif reste cependant incertaines, celui pouvant également être un monomère de protéine ayant une conformation particulière (Ferrone, 2015). La croissance d'une fibre amyloïde repose sur ses deux extrémités distales, qui exposent des groupements amides à même de créer des liaisons hydrogène avec d'autres protéines solubles, les recrutant ainsi dans la fibre amyloïde. On parle alors d'élongation, de nucléation ou de "seeding". La fibre amyloïde s'allonge, puis se fragmente quand elle atteint une longueur critique. Cette fragmentation multiplie par deux la quantité de sites d'élongation (Tanaka et al., 2006). L'agrégation est un phénomène exponentiel, dont la cinétique est dépendante des 3 étapes décrites précédemment (Jarrett and Lansbury, 1993; Knowles et al., 2009).

Le recrutement des protéines solubles implique que celles-ci exposent les groupements amines de leur squelette. Les protéines en pleine traduction, non encore prises en charge par les chaperonnes, ou les protéines intrinsèquement désordonnées sont donc particulièrement vulnérables au recrutement dans des fibres amyloïdes (Knowles et al., 2014).

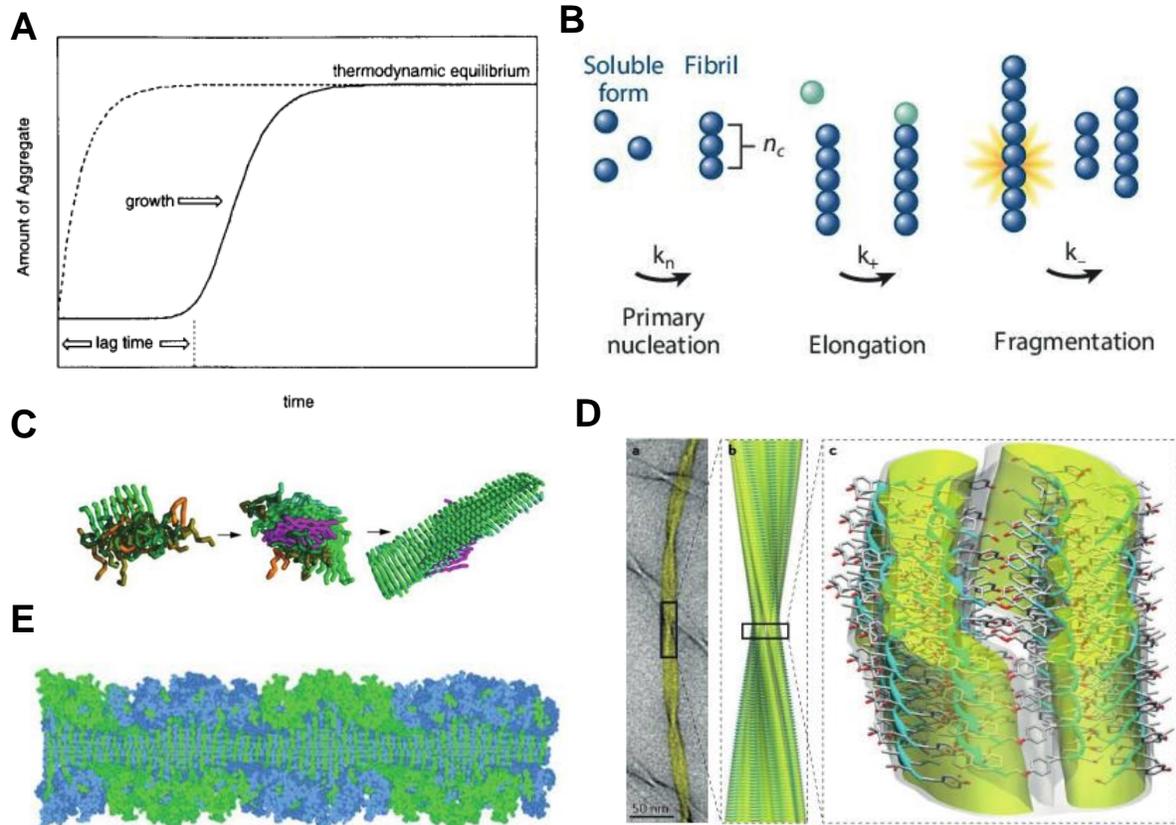


Figure 5 - Cinétique de formation et structure des amyloïdes

(A) Illustration des différentes phases de formation des amyloïdes. La ligne continue présente une formation spontanée d'amyloïde, avec une phase de délai (*lag time*) avant que l'élongation ne démarre, correspondant à la formation d'un noyau de nucléation primaire. La ligne en pointillée représente une agrégation "seedée", provoquée par l'introduction d'un agrégat préformé permettant d'outrepasser la nucléation primaire et donc la phase de délai (Jarrett and Lansbury, 1993) (B) Illustration au niveau moléculaire des phases principales de la formation d'amyloïdes (Chiti and Dobson, 2017). (C) Simulation *in silico* de la formation d'un noyau de nucléation primaire à partir d'un polypeptide, de son réarrangement progressif en fibre amyloïde puis de l'élongation de celle-ci (Auer et al., 2008). (D) (a) Image en microscopie électronique et (b, c) reconstruction à partir de données de cryo-microscopie électronique de la structure interne d'une fibre amyloïde de peptides d'amyloïde-beta (Fitzpatrick et al., 2013). (E) Modèle d'une protofibrille amyloïde de RNase A, présentant des domaines globulaires en mesure d'exercer une activité enzymatique sur les faces latérales (Sambashivan et al., 2005).

La cinétique d'agrégation des protéines en fibres amyloïde révèle ces trois étapes. On observe tout d'abord une phase initiale de longue durée, dépendante de la concentration et du volume (Jucker and Walker, 2013), qu'on appelle la phase de latence et qui correspond à la formation du noyau de nucléation initial. Plus le volume du système considéré est faible, plus la durée de la phase de

latence est longue, et l'on peut donc supposer que ce phénomène soit plutôt rare dans les cellules. On observe ensuite une phase rapide, qui correspond à l'élongation/fragmentation des fibres pendant le recrutement des protéines solubles, puis un ralentissement de la formation d'agrégats dû à l'épuisement des protéines solubles, jusqu'à atteindre un plateau. Un des aspects cruciaux de ce phénomène d'agrégation est qu'on peut outrepasser la phase initiale de latence en introduisant dans la solution un agrégat déjà formé par le même processus. On parle alors d'agrégation "seedée" ou de nucléation. Ce phénomène est une propriété générale des solutions superconcentrées, par exemple d'acide acétique. Une perturbation de ces systèmes y provoque la formation rapide de cristaux, dont la structure tridimensionnelle se propage dans la solution. Par un mécanisme similaire, la structure tridimensionnelle formée par les protéines dans les agrégats amyloïdes est capable, de par son état de faible énergie potentielle, de se propager aux protéines en solution. L'agrégation seedée est un des aspects centraux de la formation des amyloïdes, et est à la base de la dérive de ce phénomène dans de nombreuses pathologies. Cet état de faible énergie est en partie expliqué par l'alignement quasi parfait des liaisons hydrogène, qui permet leur polarisation et renforcement mutuel (Tsemekhman et al., 2007). Les résidus latéraux des protéines formant les feuillets beta s'entrecroisent entre chaque filin, dans ce qui est appelé une "fermeture éclair stérique" (*dry steric zipper*) et correspond à une complémentarité symétrique de chacun des filins de feuillets beta en une interface hydrophobe dépourvue de molécules d'eau, elle aussi extrêmement stable (Eisenberg and Jucker, 2012). La dimension de la séparation entre filin est conservée dans le spectre des amyloïdes : 9.6Å. Cette dimension caractéristique est à l'origine de la bande la plus distante du patron de diffraction, l'autre bande étant générée par l'espacement régulier de 4.8Å entre les protéines organisées en feuillets beta. Bien que la section de la protéine formant le centre de la fibre amyloïde soit confinée en une épaisseur de 4.8Å, les résidus à l'extérieur de la fibre peuvent adopter ou conserver une structure globulaire, et ainsi préserver certaines des fonctions biologiques de la protéine (Sambashivan et al., 2005). En opposition au squelette de la fibre amyloïde, dont les caractéristiques sont conservées entre protéines de séquences primaires divergentes, les faces latérales des fibres peuvent donc avoir des fonctions et caractéristiques très variées.

La plupart des protéines peuvent s'agréger en fibres amyloïdes, mais leur potentiel d'agrégation diffère de par leurs caractéristiques physicochimiques intrinsèques et leur saturation locale. Dans ce cadre, les protéines impliquées dans les pathologies à agrégats sont situées à l'extrémité de ce spectre de vulnérabilité. La phase de nucléation primaire pourrait découler d'une séparation de phase liquide-liquide générant une surconcentration locale de la protéine, et serait donc directement dépendante de la concentration de la protéine et de sa nature intrinsèquement désordonnée favorable à la formation de ces compartiments intracellulaires dépourvus de membranes (Aguzzi and Altmeyer, 2016). Les mutations ou stress environnementaux associés aux pathologies neurodégénératives modifient soit le potentiel agrégatif intrinsèque de la protéine en modifiant sa structure primaire ou son état post-traductionnel, par exemple *via* son clivage, et peuvent également modifier sa concentration en modifiant les mécanismes de régulation de son expression. Ces évènements pathologiques fondamentaux entraînent donc un "glissement" de ces protéines vers un état plus propice à leur agrégation initiale, qui peut dégénérer en autopropagation de l'agrégation selon des modalités amyloïdes. La taille des protéines semble être inversement corrélée à leur potentiel agrégatif (Chiti and Dobson, 2017).

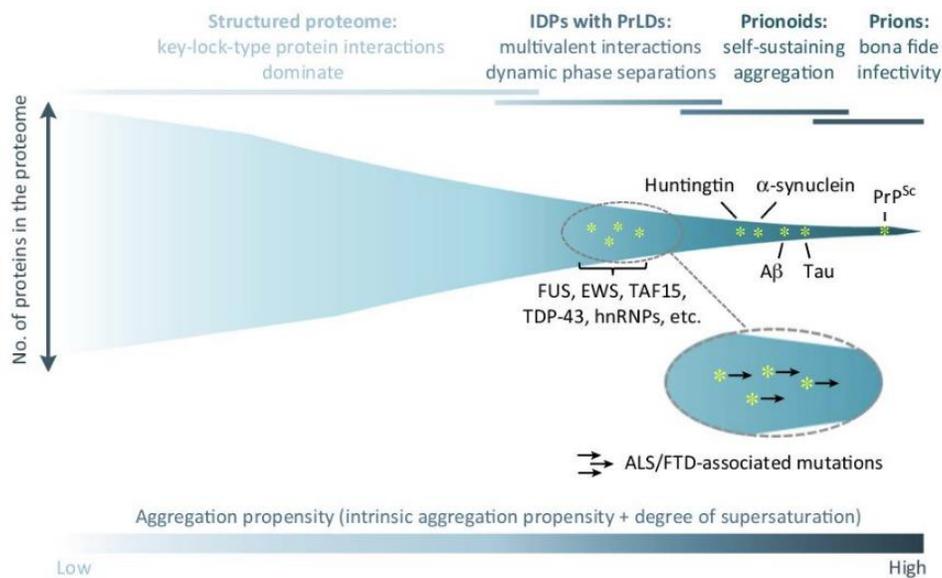


Figure 6 - Potentiel agrégatif des protéines

Les protéines formant des agrégats pathologiques sont caractérisées par un haut potentiel agrégatif, résultant non seulement de leur caractéristiques biochimiques mais également de leur concentration. Les mutations pathologiques et certains stress environnementaux augmentent le potentiel agrégatif des protéines impactées (Aguzzi and Altmeyer, 2016).

L'agrégation protéique peut également se faire *via* d'autres mécanismes que la formation de fibres amyloïdes, générant des agrégats amorphes ou encore des agrégats non enrichis en feuillets beta. La plupart des agrégats pathologiques matures forment cependant des fibres amyloïdes. Le chemin de formation des amyloïdes génère plusieurs intermédiaires oligomériques instables et dont la demi-vie est courte. Cependant, ceux-ci peuvent exercer un impact sur les fonctions cellulaires distinct de celui exercé par les agrégats de plus grande taille, et certains oligomères "*off pathway*" peuvent persister plus longtemps dans la cellule (Chiti and Dobson, 2017; Pieri et al., 2016b).

Les fibres amyloïdes sont détectables dans de nombreuses pathologies, et l'aSyn peut s'agréger en fibres amyloïdes (Serpell et al., 2000; Wood et al., 1999). La possibilité de provoquer l'agrégation par une dénaturation ou une surconcentration locale des protéines, ou par l'introduction d'agrégats préformés, a conduit à l'hypothèse que l'agrégation protéique pourrait être un phénomène central dans le développement de certaines pathologies. L'agrégation de la PrP dans les maladies à prions est l'exemple le plus connu, et parmi les mieux étudiés, d'un phénomène pathologique d'agrégation "seedée", c'est à dire autopropagative.

IV) Maladies à prions : des Prions aux Prionoïdes

1) Des maladies génétiques et transmissibles

Les maladies à prions, également appelées encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESSTs), sont des pathologies caractérisées par le repliement de la protéine PrP^c en une conformation anormale, PrP^{sc}, capable de s'autopropager comme un agent infectieux. Des ESSTs ont été décrites chez l'humain, comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD), la variante de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), le kuru, l'insomnie fatale familiale, mais également chez d'autres mammifères, comme la scrapie chez le mouton, l'encéphalopathie spongiforme bovine (BSE) et l'encéphalopathie des cervidés. Elles sont fatales, ont la particularité d'être génétiques et infectieuses, et provoquent une spongiose des tissus neuronaux et la mort des cellules nerveuses, d'où leur dénomination (Collinge, 2016).

2) Des agents pathogènes non conventionnels

L'étiologie des maladies à prion est restée mystérieuse pendant de nombreuses années. Au XVIII^e siècle est décrite une maladie touchant les mouton Mérinos qui les pousse à se gratter violemment. Cette pathologie hautement contagieuse (Cuillé and Chelle, 1936) est alors appelée "scrapie" (to scrape = se gratter en anglais). Cependant que la révolution scientifique en matière de microbiologie, initiée par l'invention du microscope, permet de comprendre de nombreuses infections pendant les deux siècles suivants, la compréhension de la scrapie reste au point mort. Entre 1862 et 1876, Pasteur démonte le concept de génération spontanée, Cohn réalise la première classification de bactéries, et Koch démontre qu'une bactérie est l'agent causal de l'anthrax (Thomas D. Brock, n.d.). Sont ensuite découverts les virus, d'une taille sub-micrométrique, inférieure à celle de la plupart des bactéries. Ils sont isolés en 1892 par Ivanoski et nommés en 1898 par Beijerinck. La structure du premier virus, un bactériophage, est obtenue par cristallographie par Wendell Stanley en 1935, ce qui lui vaudra plus tard le prix Nobel pour la découverte d'une "protéine infectieuse" (Norrby, 2008; Stanley, 1935). La découverte des d'acides nucléiques fut suivie de la démonstration que ceux-ci étaient nécessaires pour la fonction des virus (Hershey and Chase, 1952). Watson et Crick élucident le code génétique et la fonction des acides nucléiques en 1953

(Watson and Crick, 1953). Ils établissent ensuite le "dogme central de la biologie moléculaire", qui postule que l'information se propage de l'ADN à l'ARNs puis à la protéine (Crick, 1970). Cependant, le phénomène prion allait bousculer ce dogme en mettant en évidence un autre mécanisme de propagation de l'information dans le vivant (Zabel and Reid, 2015).

3) *Prémices de l'hypothèse prion*

Cependant qu'une nouvelle ESST, le kuru, est découverte chez l'humain au milieu du XXème siècle, les mécanismes de transmission de ces pathologies restent mystérieux. Le kuru est une pathologie endémique de la tribu des Forés, en Nouvelle Guinée, et s'y transmet *via* la consommation rituelle des morts (Gajdusek and Zigas, 1959; Hadlow, 1959; Klatzo et al., 1959). Un parallèle est rapidement établi entre kuru, scrapie et MCJ sur la base de caractéristiques épidémiologiques et neuropathologiques, notamment la très longue durée d'incubation (Hadlow, 1959). La théorie prédominante a longtemps été que les ESSTs sont causées par un "virus lent" (Gajdusek, 1967). Cependant, aucun virus ni bactérie n'est associé à ces pathologies (Beck and Daniel, 1969; Gajdusek, 1977; Gibbs et al., 1968). L'agent infectieux de la scrapie présente un spectre de résistance atypique aux méthodes habituelles de neutralisation : ionisation, irradiation aux rayons UV fortes températures et/ou pressions, méthodes chimiques. Son spectre d'inactivation mène Auer à postuler que sa réplication ne dépend pas des acides nucléiques (Alper et al., 1967). Griffith spécule que l'agent infectieux est une protéine, et propose plusieurs mécanismes pouvant expliquer son autopropagation (Griffith, 1967). Parmi les trois scénarios qu'il avance, l'un est proche de notre conception actuelle du processus : il propose que l'état dimérisé d'une protéine puisse se transmettre aux protéines solubles. Pour cela, il s'inspire d'une expérience de pensée proposée par Penrose et Penrose en 1957 pour illustrer la possibilité de l'existence de phénomènes autopropagatifs dans des systèmes simples :

Considérons deux élément mobiles A et B pouvant glisser le long d'un rail et ne pouvant s'entrecroiser, tels que les éléments s'entrechoquent régulièrement, et qu'A et B sont disposés alternativement. Les éléments A et B sont trop stables à l'état basal pour changer d'orientation, mais l'introduction d'un dimère A+B peut induire, par le biais des chocs et de la forme du dimère, le basculement d'A ou de B et leur adhésion. Le dimère nouvellement formé peut à son tour faire

basculer les autres blocs : il s'agit d'un processus autopropagatif. Ainsi, le système passe d'un état basal riche en monomères à un état riche en dimères à l'issue des chocs successifs entre éléments. Il est également intéressant de noter que B et A peuvent se dimériser de deux façons distinctes, et que ces deux arrangements distincts propagent leur propre structure, ce qui anachroniquement apporte une base théorique à l'existence de souches (Penrose and Penrose, 1957).

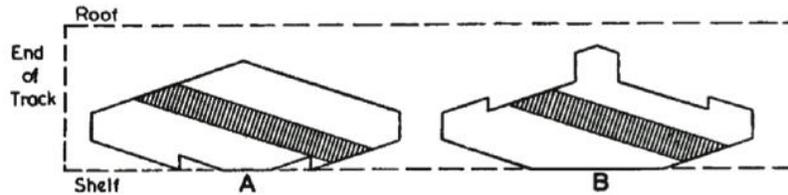


Fig. 1. Elements *A* and *B* in neutral positions on the track

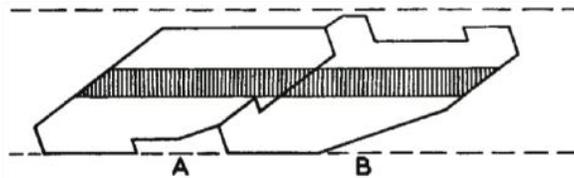


Fig. 2. Elements *A* and *B* hooked together

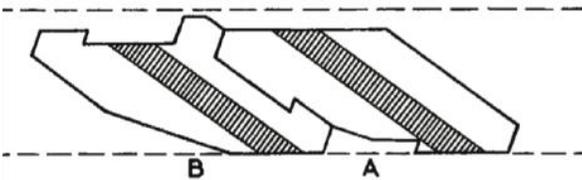


Fig. 3. Alternative complex of *B* and *A*

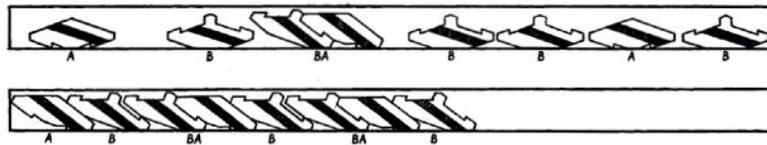


Figure 7 - Illustration d'un mécanisme simple d'autoréplication

Expérience de pensée proposée par Penrose & Penrose en 1957. Deux types de blocs sont organisés en série sur des rails, et peuvent s'imbriquer sous la forme de dimères. L'introduction d'un dimère dans le système, si des chocs répétés se produisent entre les éléments, va propager l'état dimérisé au reste du système (Penrose and Penrose, 1957).

4) Stanley Prusiner et l'hypothèse prion

L'équipe de Stanley Prusiner publie en 1982 plusieurs éléments supportant la nature protéique de l'agent infectieux de la scrapie. Prusiner publie d'abord des expériences prouvant que des traitements modifiant spécifiquement les acides nucléiques n'empêchent pas la transmission de la scrapie, et que la taille de l'agent est très petite : aux alentours de 50kDa (Prusiner, 1982). La co-

purification de l'infectivité avec les protéines mène Prusiner à proposer le terme de "particule prion" (mot-valise pour *proteinacious infectious*) pour dénoter cet agent infectieux distinct des virus, bactéries, plasmides et viroïdes. Il appuie ensuite cette hypothèse en comparant les conditions modifiant l'infectivité de la scrapie et celle d'un viroïde, agent infectieux entièrement composé d'ARN. Il établit que des traitements modifiant les protéines, tels que la digestion à la protéinase K, ou une exposition au phénol, inactivent la scrapie mais pas le viroïde, alors que des agents perturbant les acides nucléiques inhibent le viroïde mais pas la scrapie. (Diener et al., 1982). L'équipe de Prusiner parvient ensuite à identifier le composant majeur de l'infectivité prion : la protéine PrP, pour "prion protein" (Bolton et al., 1982). Les tissus infectés sont extrêmement contagieux, l'injection intracérébrale de 50 µl de tissus dilués au millionième infectant 100% des animaux exposés (Prusiner et al., 1982). Prusiner reçut le prix Nobel en 1997 pour ses travaux sur les prions, cependant que la communauté scientifique ne s'accordait toujours pas sur la validité de l'hypothèse prion. La preuve de la nature protéique de l'agent fut apportée plus tardivement, notamment grâce à la technique de *protein misfolding cyclic amplification* (PMCA) et à la génération d'infectivité à partir de PrP recombinante (Castilla et al., 2005; Choi et al., 2016; F. Wang et al., 2010).

5) Crise de la vache folle

L'apparition de la maladie dite de « la vache folle », l'encéphalopathie spongiforme bovine, (BSE) dans des troupeaux européens dans les années 80 a contribué à faire avancer la recherche sur ces pathologies. Les modalités de transmission de la BSE sont assez similaires à celle du kuru chez les Forés, car les vaches étaient nourries de farines animales contenant des restes de carcasses de bovins infectés. La PrP^{sc} a la caractéristique d'être résistante aux traitements d'inactivation des pathogènes classiques, et a donc pu s'amplifier dans cette boucle de cannibalisme bovin (Taylor, 2002). Cette pathologie a pu se transmettre à l'humain : quelques centaines de consommateurs de viande bovine développèrent une maladie à prion suite à l'exposition à cette PrP d'origine bovine. Les symptômes présentent quelques similarités avec ceux de la CJD, d'où le terme de vCJD. La vCJD est cependant beaucoup plus agressive que la CJD (Hill et al., 1997; Prusiner, 1997). Cependant, l'incubation des maladies à prions peut être extrêmement longue. On a en effet détecté des cas de kuru chez les Forés entre 1996 et 2004, alors que le cannibalisme n'est plus pratiqué

depuis les années 50. La période d'incubation de ces malades a donc été au minimum de 34 à 41 ans, ce qui signifie que des personnes exposées aux prions de l'encéphalopathie spongiforme bovine pourraient continuer à déclarer des cas de vCJD dans les prochaines décennies (Collinge et al., 2006). L'effort de recherche nourri sur la BSE et la vCJD a permis de mieux comprendre les prions.

6) La PrP

La protéine PrP est encodée par le gène PRNP. Sous sa forme physiologique notée PrP^c (pour "cellulaire"), c'est une protéine extracellulaire associée à la membrane dont le transcrit initial fait 256 acides aminés, clivé en un résidu de 209 acides aminés après élimination post-traductionnelle des séquences signal (Kupfer et al., 2009). Elle contient 3 hélices alpha et un court feuillet beta antiparallèle (Riek et al., 1996; Stahl et al., 1987) (Fig 8A). La PrP^c est une protéine ubiquitaire multifonctionnelle impliquée dans de nombreuses fonctions neuronales, entre autres le développement du cerveau, le guidage axonal, la formation de synapses, la survie neuronale et la résistance au stress oxydant (Linsenmeier et al., 2017). Elle est très exprimée dans les neurones du SNC (Harris et al., 1993, p. 199; Manson et al., 1992).

La forme pathologique, PrP^{sc} (pour "scrapie"), a une structure très différente de celle de la PrP^c, étant constituée pour moitié de feuillets beta (Caughey et al., 1991) (Fig 8B). Une structure estimée par cryo microscopie électronique a été proposée en 2004 (Govaerts et al., 2004). Cela signifie donc que si la protéine mature PrP^c est recrutée dans les agrégats, elle doit subir un réarrangement extrême de sa structure, qui passe sans doute par un intermédiaire partiellement dénaturé (Wille and Requena, 2018). Les modalités de ce réarrangement sont encore mal comprises.

7) Détection de la PrP^{sc}

L'agent infectieux des maladies à prions a été historiquement identifié sur des bases biochimiques. Ces mêmes caractéristiques sont encore utilisées pour distinguer la PrP^{sc} de la PrP^c. La PrP^{sc} est insoluble dans certains détergents, et certains des agrégats sont biréfringents après coloration au rouge du Congo, indiquant leur nature amyloïde (Prusiner et al., 1983). Elle est partiellement résistante à la digestion par la protéinase K (PK), qui génère des espèces de poids moléculaires caractéristiques dans une gamme de concentrations à laquelle la PrP^c est complètement digérée.

Le produit de la digestion partielle à la PK de la PrPsc est encore infectieux, et est nommé sur la base de son poids moléculaire PrP 27-30. La digestion à la PK, initialement utilisée par Prusiner dans ses premières publications sur la nature protéique de l'agent (Prusiner, 1982), reste un test de référence pour détecter la PrPsc (Riesner, 2003). La PrPsc peut également être détectée et caractérisée par amplification *in vitro* par *protein misfolding cyclic amplification* (PMCA), une méthode proche sur le principe de la *polymerase chain reaction* (PCR). L'inoculation intracérébrale dans des modèles animaux est cependant le seul protocole permettant d'affirmer la nature infectieuse d'un agent.

8) Amplification seedée *in vitro* de la PrPsc

La conversion de la PrPc en PrPsc *ex cellulo* a éclairé plusieurs aspects biochimiques de ce processus. La plus grande efficacité de conversion dans un lysat cellulaire que dans une solution de PrPc purifiée suggéra l'existence de cofacteurs (Saborío et al., 1999). L'amplification des agrégats *in vitro* fut grandement améliorée avec la PMCA, qui tire parti d'une sonication à intervalles réguliers pour générer de nombreux petits agrégats seedants (Saborio et al., 2001). Ce processus met en avant l'importance de la fragmentation pour la réplication de PrPsc, et permet de répliquer indéfiniment la structure de la PrPsc. En effet, l'infectivité est préservée *via* ce processus après la dilution à 10^{55} de l'échantillon initial (Castilla et al., 2006, 2005). Une version modifiée de la PMCA permet de mettre en évidence que l'ajout de polyanions à une solution de PrPc purifiée permettait à des agrégats de PrP recombinante de convertir la PrP soluble avec une efficacité similaire à celle d'homogénats de cerveau d'animaux malades (Deleault et al., 2005). Étonnamment, la présence de polyanions permet également la conversion spontanée de la PrPc en PrPsc sans ajout d'agrégat seedant (Deleault et al., 2007). L'amplification de la mauvaise conformation peut également être réalisée en l'absence de cofacteurs dans une solution de PrP recombinante et sans sonication, suivant le protocole de *quaking induced conversion* (QUIC), qui repose sur l'agitation plutôt que la sonication (Atarashi et al., 2008, 2007). Les produits obtenus suivant ce dernier protocole n'ont cependant pas démontré de potentiel infectieux (Green and Zanusso, 2018). Ainsi, la PMCA a permis d'éclairer certains aspects biochimiques de la conversion de la PrPc en PrPsc, dont l'importance de la fragmentation et de cofacteurs polyanioniques.

9) Structure des assemblages de PrPsc

La PrPsc peut former des plaques amyloïdes et se propager selon le processus de nucléation-élongation-fragmentation (Kitamoto et al., 1986; Knowles et al., 2009). Selon le scénario amyloïde, les formes solubles de la PrPc sont recrutées par les fibres amyloïdes de PrPsc à leurs extrémités distales (Collinge, 2016; Come et al., 1993; Gajdusek, 1988). Il se peut cependant que d'autres mécanismes de propagation non amyloïdes n'aient pas encore été mis en évidence. La structure de l'agent infectieux des maladies à prions n'a en effet toujours pas été élucidée avec certitude. Un premier obstacle a été l'extrême infectiosité des échantillons, et leur résistance à l'élimination. Qui plus est, les échantillons de tissus sont très hétérogènes. Des agrégats infectieux peuvent être générés à partir de PrP recombinante produite dans des bactéries en présence de lipides et d'ARN (Choi et al., 2016; F. Wang et al., 2010). Cependant, le titre d'infectivité de ces préparations est bien inférieur à celui des extraits biologiques, ce qui indique qu'une majorité des espèces générées de cette manière ne sont pas infectieuses (Jackson et al., 1999; Schmidt et al., 2015). Ainsi, étudier les espèces générées de cette manière pourrait revenir à caractériser majoritairement la structure d'assemblages non-infectieux de PrP. Cependant, les études réalisées à partir de ces fibres recombinantes ont permis de suggérer des structures pour les fibres amyloïdes infectieuses. L'une de ces conformations théoriques a pour unité de base un monomère de PrPsc replié en beta-solénoïde à quatre anneaux, formant deux filins enroulés l'un autour de l'autre. Elle a été observée par plusieurs techniques, dont la microscopie cryo-électronique (cryo-EM) (Govaerts et al., 2004; Vázquez-Fernández et al., 2016a) (Fig 8C). L'infectivité prion d'homogénats de cerveaux de souris a récemment été associée à la présence de bâtonnets de PrP de quelques dizaines de nm et organisés en deux filins enroulés l'un autour de l'autre, une structure compatible avec celle théorisée par cryo-EM (Terry et al., 2016). Cependant, l'agent infectieux pourrait avoir une nature non-amyloïde. En effet, l'injection sériée de la BSE dans des souris peut se faire sans détection des conformères habituels de la PrPsc (Lasmézas et al., 1997). Quoi qu'il en soit, il est clairement établi que l'agent infectieux des maladies à prions est très majoritairement protéique par nature, et que son exposition par injection ou ingestion est contagieuse. Les mécanismes de cette infection restent cependant incomplètement compris, malgré près de 40 ans de recherche intensive.

10) Rôle de la séquence primaire de la PrP et barrière de transmission

La séquence primaire de la PrP a un impact important sur l'efficacité de transmission de la pathologie. En effet, le temps d'incubation de la pathologie chez des modèles murins après exposition à des échantillons infectieux est lié à la séquence primaire de *PRNP* (Moore et al., 1998; Westaway et al., 1987). Qui plus est, les patients qui développèrent la vCJD après leur exposition à la BSE étaient tous homozygotes pour le codon Met¹²⁹, tandis que le codon Val¹²⁹ semble être protecteur contre la transmission des ESSTs (Mead et al., 2003; Wadsworth et al., 2004). Une différence de séquence primaire entre la PrP exprimée par l'hôte et celle composant les agrégats auxquels il est exposé inhibe la transmission de la pathologie, un phénomène dénommé barrière d'espèces. Le passage d'une barrière d'espèces par la pathologie peut générer de nouvelles souches de prion, un évènement détaillé dans le paragraphe suivant. Différentes souches composées de PrP de la même séquence primaire ne rencontrent pas la même barrière de transmission quand injectées dans le même modèle animal (Béringue et al., 2008; Le Dur et al., 2005). Le temps d'incubation après injection est inversement corrélé au niveau d'expression de la PrPc chez l'hôte (Prusiner et al., 1990; Scott et al., 1989), et les souris knockout (KO) pour le gène *PRNP* sont résistantes à l'infection prion (Büeler et al., 1993). Les souris hétérozygotes pour *PRNP*, c'est à dire n'ayant qu'un seul allèle, ont une période d'incubation plus longue que les souris homozygotes pour *PRNP*, mais produisent cependant une quantité similaire de PrPsc et de titre infectieux (Büeler et al., 1994). Cet effet contre-intuitif pourrait provenir de la génération d'agrégats toxiques distincts de PrPsc dans une deuxième phase de la pathologie, un processus détaillé dans le paragraphe portant sur les souches.

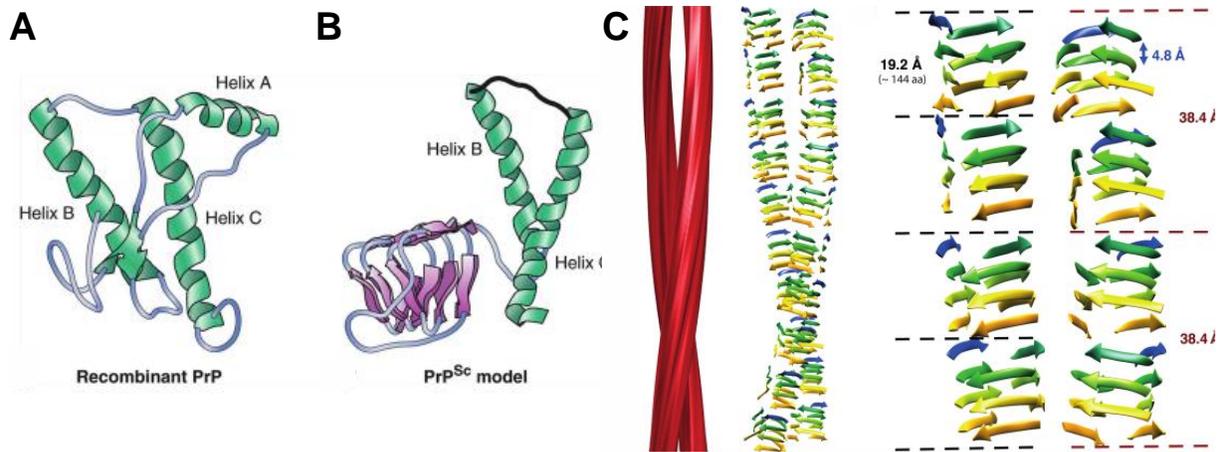


Figure 8 - Structure de la PrPc et de la PrPsc

(A) Structure de la PrPc. (B) Modèle de la structure de la PrPsc, enrichie en feuillets beta (“Harrison’s Neurology in Clinical Medicine, 3E,” n.d.). (C) Modèle d'une fibre de PrP 27-30 obtenue à partir de données de cryo-EM (Vázquez-Fernández et al., 2016b).

11) Propagation intercellulaire de la PrPsc

Suite à une exposition orale ou intrapéritonéale, la PrP^{Sc} se propage depuis la périphérie en envahissant les cellules dendritiques dans les tissus lymphoïdes (Glaysher and Mabbott, 2007) où il y a une réplique active des prions, puis vers les cellules épithéliales phagocytaires (Donaldson et al., 2016, 2012). Après l'étape de réplique périphérique suit l'étape de neuroinvasion pendant laquelle la PrP^{Sc} est transmise aux nerfs sympathiques innervant les tissus lymphoïdes par un mécanisme encore mal connu, potentiellement *via* des vésicules extracellulaires, les exosomes (Denzer et al., 2000; Klöhn et al., 2013). L'infection se propage ensuite en suivant les connexions neuroanatomiques (Buyukmihci et al., 1983; Fraser, 1982; Kimberlin and Walker, 1986). L'atteinte du CNS depuis la périphérie pourrait également se faire *via* la circulation sanguine. En effet, les organes circumventriculaires dépourvus de barrière hémato-encéphalique sont systématiquement atteints plus précocement que les régions avoisinantes chez les moutons infectés par la scrapie. Additionnellement, les régions cérébrales connectées à ces organes développent des inclusions dans un deuxième temps, suggérant une propagation *via* les connexions neuronales depuis ceux-ci (Sisó et al., 2010). La propagation serait dépendante de l'expression de la PrPc dans les tissus lymphoïdes (Brown et al., 1999), les nerfs périphériques (Glatzel and Aguzzi, 2000) et le SNC (Büeler et al., 1993). Cependant, son expression n'est pas requise pour l'internalisation et le transport de la PrP^{Sc} dans des cellules mobiles (Takakura et al., 2011), et l'exposition

intrapéritonéale de souris exprimant la PrP sous contrôle d'un promoteur neuronal sur un fond *PRNP*^{-/-} est suivie de l'apparition de dépôts de PrPsc dans le cerveau (Crozet et al., 2007). Ainsi, il apparaît que l'expression de la PrP dans le SNC est nécessaire pour l'infection de celui-ci, mais l'impact de l'expression périphérique extraneuronale de la PrP reste incertain. Les mécanismes moléculaires de transfert intercellulaire de l'agrégation sont encore mal connus, et les éléments à notre disposition proviennent majoritairement de cellules immortalisées en culture. Notamment, les modalités de transfert interneuronale, et l'impact des structures synaptiques sur ce transfert sont encore inconnus. Les prions peuvent être transférés à l'intérieur ou à l'extérieur de vésicules extracellulaires (Fevrier et al., 2004) ou de *tunneling nanotubes* (Gousset et al., 2009) dans des lignées cellulaires, mais la pertinence de ces mécanismes dans le transfert interneuronale reste incertaine. Bien que les assemblages de PrPsc puissent être transportés activement le long des axones, la nécessité de ce transport axonal pour leur propagation reste incertaine (Kratzel et al., 2007; Künzi et al., 2002; Magalhães et al., 2005; Moya et al., 2004). Si la propagation de la PrPsc reposait sur des contacts synaptiques, alors varier le site d'injection ferait varier les régions dans lesquels la PrPsc se dépose. Les résultats obtenus à ce sujet sont contradictoires, mais semblent indiquer que le tropisme cellulaire de certaines souches est indépendant du site d'injection (Casaccia-Bonofil et al., 1993; Langevin et al., 2011; Vickery et al., 2013). Par ailleurs, le fait que la PrPsc se disperse et s'amplifie dans le cerveau de souris n'exprimant la PrP que dans les astrocytes laisse penser que des relais non-neuronaux puisse partiellement contrôler la dispersion des prions (Raeber et al., 1997), mais la dispersion depuis la périphérie au SNC de l'agrégation dans des animaux exprimant une PrP strictement neuronale indique que ceux-ci ne sont pas cruciaux pour l'invasion des tissus nerveux (Crozet et al., 2007). Ces observations ne remettent pas fondamentalement en doute la possibilité d'un transfert synaptique. En effet, un scénario "en deux phases" réconcilie ces observations avec un passage trans-synaptique : 1) propagation trans-synaptique rapide d'agrégats dans le SNC suivie de 2) réplication lente de la PrPsc selon la vulnérabilité intrinsèque des populations cellulaires.

12) Souches

L'un des aspects fascinants des assemblages de prions est leur polymorphisme. En effet, des agrégats de PrP formés à partir de la même séquence primaire peuvent provoquer des pathologies

distinctes, uniquement sur la base de leur structure tridimensionnelle (Aguzzi et al., 2007) (Aguzzi A NAt Rev Mol Cell Biol 2007). Les conséquences de l'injection de ces agrégats, telles que le temps d'incubation, le profil des lésions dans le SNC et les symptômes cliniques se conservent lors d'un passage sérié chez des individus exprimant la même séquence primaire de PrP, à conditions que l'injection se fasse toujours selon les mêmes modalités (Bruce, 1993). Ainsi, des souches distinctes engendrent des pathologies distinctes. Les propriétés biochimiques des agrégats sont également préservées lors de ces passages sériés, entre autres le poids moléculaire des espèces générées par digestion à la PK (Bessen and Marsh, 1994), les sites de glycosylation (Hill et al., 1997), la résistance à la dénaturation (Safar et al., 1998) ou la taille des espèces (Tixador et al., 2010). Les souches diffèrent selon la structure de leur *steric zipper* : des résidus distincts sont donc exposés sur les faces latérales ou distales des agrégats, et les propriétés physiques de ces derniers peuvent également différer (Greenwald and Riek, 2010; Wiltzius et al., 2009). Ainsi, les différences d'activité biologique entre les souches tiennent en grande partie à la structure des agrégats autopropagés. L'une des caractéristiques frappantes des souches est la différence de leur tropisme : les régions dans lesquelles la PrP^{sc} se réplique le plus diffèrent de souche à souche. Ce tropisme pourrait être basé sur une affinité plus ou moins grande des agrégats pour des protéines de surface spécifiques, sur l'enrichissement plus ou moins grands de certaines formes post-traductionnelle de la PrP^c, ou bien d'autres caractéristiques intrinsèques des différentes populations cellulaires du SNC. La diversification d'une souche en une ou plusieurs autres peut être provoquée par son administration à un animal exprimant une séquence primaire de PrP distincte, c'est à dire lors du passage d'une barrière d'espèce (Béringue et al., 2007). L'infection se fait alors de façon moins efficace dans un premier temps, puis s'améliore au cours de transmissions sériées, plusieurs souches pouvant être générées au cours de ce processus (Bessen and Marsh, 1992; Bruce et al., 1994). L'efficacité de cette propagation est non seulement liée à la séquence primaire de la PrP, mais également à la souche de PrP, certaines barrières d'espèces étant plus aisément franchies par une souche que par une autre. La transmission de certaines souches à une espèce provoque un changement de leur structure lors du recrutement de la protéine endogène de l'hôte, ce qui provoque l'apparition d'un nouveau conformère et donc d'une nouvelle souche. Ainsi, certaines souches récoltées chez des individus atteints de vCJD, et donc infectés par des prions de BSE, étaient plus infectieuses pour des souris WT que pour des souris exprimant la PrP bovine (Collinge, 2016). Ces

observations menèrent John Collinge à théoriser que plusieurs souches de PrP^{sc} coexistent dans un hôte infecté, et que le passage à un nouvel hôte sélectionne une sous-partie de ces souches, compatibles avec le nouvel hôte (Collinge and Clarke, 2007) (Fig 9). On peut même considérer que chez un individu infecté, il n'y a pas une seule souche "cristalline" se propageant fidèlement, mais un nuage de polymorphes. En effet, de nombreuses souches sont intrinsèquement instables (Bessen and Marsh, 1994), et des extraits de tissus peuvent contenir plusieurs souches (Polymenidou et al., 2005), qui diffèrent selon leurs caractéristiques biochimiques et physiques (Taylor et al., 1998) (Taylor D Vet Microbiol 1998). Ainsi, tout comme les quasiespèces virales, les prions existent sous la forme d'un nuage de conformations (Collinge and Clarke, 2007; Li et al., 2010; Oelschlegel and Weissmann, 2013). Plus intrigant encore, il semble que deux sous-espèces distinctes soient générées successivement au cours d'une infection prion, et soient respectivement responsables de l'infectiosité et de la toxicité. La deuxième espèce, dénommée PrP^{Sc} (pour *lethal*), apparaît longtemps après que l'infectiosité des tissus (et donc le niveau de PrP^{Sc}) ait atteint un plateau (Sandberg et al., 2011). La vitesse de génération de PrP^{Sc} sature à partir d'un certain niveau d'expression de PrP^C, ce qui n'est pas le cas pour PrP^{Sc}.

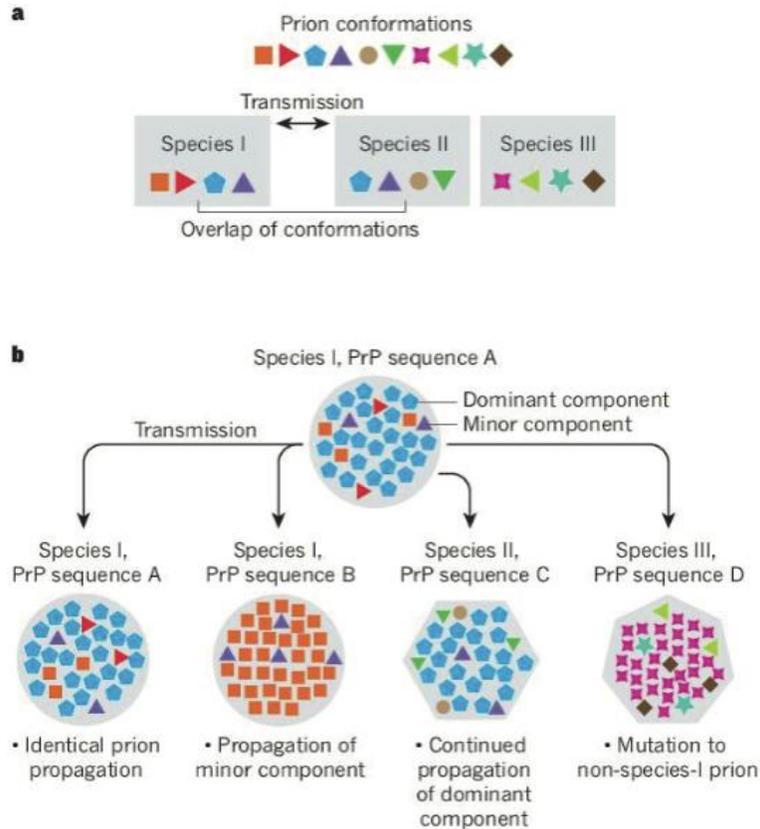


Figure 9 - "Quasi-souches" de prions et barrière d'espèce

Modèle théorique expliquant la génération de nouvelles souches de prions au passage de barrières d'espèce. (a) Les agrégats prion existent sous la forme de plusieurs conformations au sein d'une même espèce, et la facilité de ces prions à se transmettre d'une espèce I à II dépend de la similarité des agrégats présent chez I avec les agrégats pouvant se propager dans II. Peu ou pas de recouvrement entre ces deux groupes limite fortement l'efficacité de la transmission, comme ici entre I et III. (b) Sélection de "quasi-souches" d'agrégats lors de la transmission d'une espèce à une autre (Collinge, 2016).

Ainsi, des agrégats formés de protéines de même séquence primaire peuvent présenter des propriétés extrêmement divergentes, et autopropager des phénomènes distincts dans des cellules distinctes. L'apparition de nouvelles souches peut être liée à tout un ensemble de paramètres, notamment la concentration de la PrPc (Le Dur et al., 2017), et le passage de barrières d'espèces (Collinge et al., 1996). On peut également supposer que des protéines solubles présentant certaines modifications post-traductionnelles (MPTs) ou localisées dans un certain environnement (pH, sels, partenaires protéiques, structure 3D) puissent modifier la probabilité d'apparition de certaines quasi souches, et que donc chaque protéine soluble recrutée dans un agrégat prion puisse constituer une probabilité de générer une nouvelle souche.

13) Prions non PrP et prionoïdes de type I et II

Des prions formés à partir de protéines distinctes de la PrP ont été identifiés dans de nombreux organismes, notamment la levure. L'étude des prions de levure a fourni énormément d'information sur la biologie des prions, ce modèle permettant de générer des données à bien plus haut débit que les modèles animaux. Notamment, la propagation du phénotype [PSI⁺] repose sur la forme prion de la protéine Sup35, et la propagation de celle-ci repose sur la présence d'un cofacteur, la chaperonne Hsp104. Le rôle de Hsp104 met en évidence une propriété des prions similaire à celui des amyloïde, qui est que la fragmentation est nécessaire pour la propagation efficace de l'agrégation. En effet, la fragmentation des fibres permet de générer de nouvelles extrémités distales pouvant recruter des protéines solubles (Kushnirov and Ter-Avanesyan, 1998). Cette propriété se vérifie également pour la PrP (Piening et al., 2005). Les prions semblent jouer un rôle fonctionnel dans les levures. La forme prion de ces protéines s'autopropage dans un faible pourcentage de cellules, ce qui permettrait un type de *bet hedging* (minimisation des risques) évolutif. Cette sous-population contenant la forme prion d'une protéine présente en effet des capacités biologiques distinctes, dans son métabolisme ou la consommation de certains nutriments. Ces caractéristiques la rendent moins adaptée à un contexte idéal de croissance pour le reste de la population, mais permettent à la colonie d'augmenter ses chances de survie en cas de changement environnemental radical. Les prions de levure ont permis de mieux comprendre de nombreux mécanismes généraux des phénomènes prion, dont la biologie des souches. La plupart de ces prions se propagent comme des amyloïdes, par nucléation/élongation/fragmentation (Collins et al., 2004; Wickner et al., 2010). Certains prions, tels que CPEB chez l'aplysie, auraient un rôle fonctionnel dans le système nerveux en jouant un rôle dans les mécanismes de plasticité synaptique (Rayman and Kandel, 2017; Si et al., 2010). Le comportement prion de CPEB reste cependant cantonné à sa cellule d'origine. Récemment, le concept de prion a été étendu aux protéines formant des agrégats dans les maladies neurodégénératives, telles que tau et A β dans la MA, et l'aSyn dans la MP (Walker and Jucker, 2015). On peut distinguer les protéines à caractère prion selon l'échelle à laquelle elles se propagent : les prions se propagent d'individus à individus, les prionoïdes de type I se propagent entre cellules, et les prionoïdes de type II restent cantonnés à l'environnement intracellulaire (Jarosz and Khurana, 2017). Dans les synucléinopathies, l'aSyn serait alors un prionoïde de type I.

Conclusion

L'étude des maladies à prions et des amyloïdes a permis de mettre à jour des caractéristiques importantes de ces phénomènes : cinétique en trois étapes, agrégation seedée, structure des agrégats protéiques, présence de souches, importance de la séquence primaire, résistance à la digestion protéique, importance des chaperonnes, etc. Dès que l'hypothèse d'un comportement prion-like de l'aSyn et d'autres protéines a été formulée, ces connaissances ont été appliquées à l'étude de leur comportement et de leur agrégation, et ont permis de démontrer des caractéristiques communes à celles-ci et à la PrP. Nous allons maintenant aborder les caractéristiques physiologiques et pathologiques de l'aSyn pour démontrer la vraisemblance de son comportement prion-like.

V) Structures, fonctions et localisations de l'aSyn

L'hypothèse prion-like dans les synucléinopathies postule que l'agrégation de l'aSyn se propage dans le SNC et provoque des troubles neuronaux. Afin de mieux comprendre les modalités et les impacts de ce processus, il faut s'intéresser à la biologie de cette protéine dans un contexte physiologique.

1) Séquence et structure

L'aSyn est une petite protéine soluble de 140 acides aminés, encodée chez l'humain par le gène *SNCA* situé sur le chromosome 4, au locus 4q21 (Uéda et al., 1993). Elle est très exprimée dans les tissus neuronaux, dans lesquels elle pourrait constituer près de 1% des protéines cytosoliques (Iwai et al., 1995). Elle fait partie de la famille des synucléines, dont les autres membres sont la bêta-synucléine et la gamma-synucléine (Goedert et al., 2017b). Sa séquence peut être divisée en trois sous-domaines structuraux (Fig 10A). Le domaine N terminal (résidus 1-60) contient 7 répétitions d'une séquence semi-conservée de 11 résidus contenant le motif consensus XKTKEGVXXXX. Ce domaine peut former une hélice alpha amphipatique, stabilisée par les membranes lipidiques *via* ce motif (Fig 10B). Il se retrouve uniquement dans la famille des synucléines, bien qu'il présente quelques similarités avec un domaine présent chez les apolipoprotéines. La région centrale (résidus 61-95), très hydrophobe, est appelée NAC (non-amyloid-beta component). Il s'agit en effet de la portion de l'aSyn originellement identifiée dans les plaques amyloïdes dans la MA (Hashimoto et al., 2000; Uéda et al., 1993) (Ueda PNAS 1993, Hashimoto Am J Pathol 2000). Elle est également importante pour l'agrégation de l'aSyn, la délétion de segments dans cette région réduisant fortement sa capacité à s'agréger (Giasson et al., 2001). Cette région peut également former une hélice alpha. Le domaine C-terminal (résidus 96-140) est une région acide intrinsèquement désordonnée (Bertini et al., 2007; Wu et al., 2008) dont les fonctions sont encore mal connues. Il s'agit de la partie la moins conservée de l'aSyn au cours de l'évolution. Elle interagit avec les partenaires protéiques de l'aSyn (Jensen et al., 1999), et également avec des ions métalliques et des petites molécules (Eliezer et al., 2001; Ulmer et al., 2005). La plupart des mutations ponctuelles dans *SNCA* liées à des formes familiales de MP sont localisées dans les régions N terminale et

centrale, qui forment le cœur de la fibre amyloïde (Guerrero-Ferreira et al., 2018; Li et al., 2018) (Li Y Cell Research Nature 2018, Guerrero-Ferreira eLife 2018) (Fig 10C).

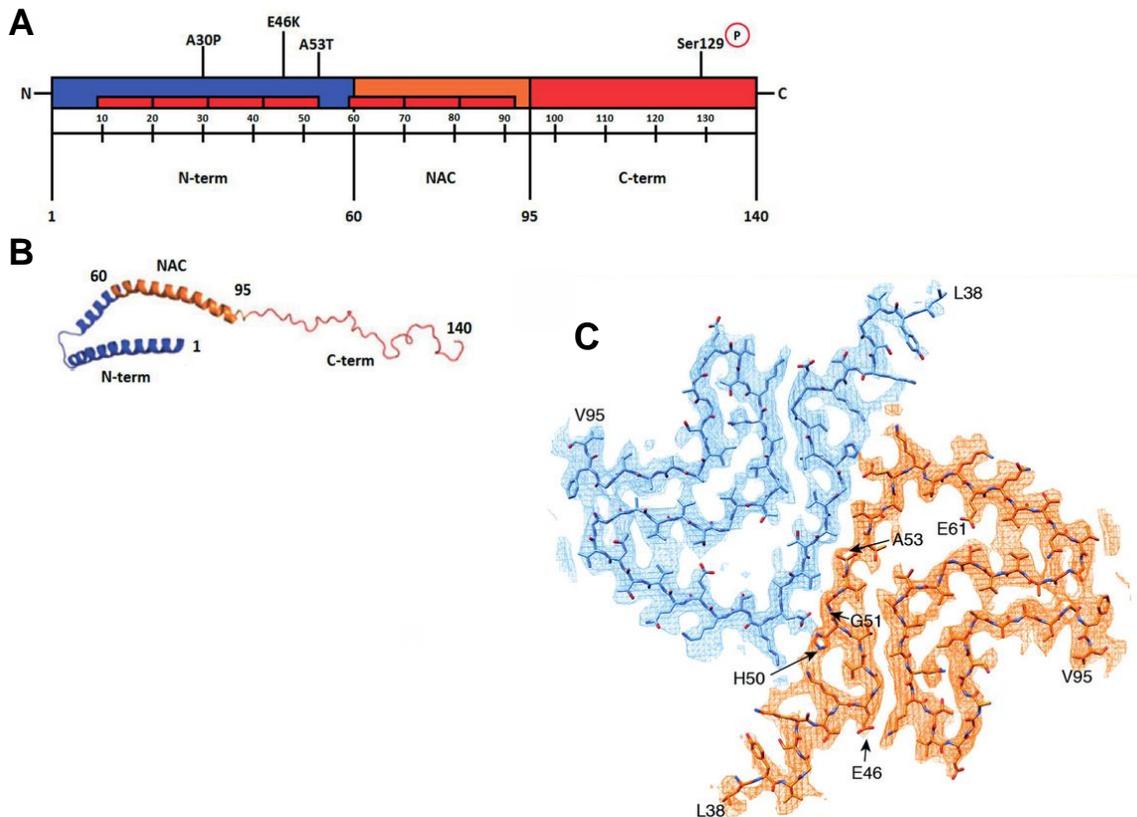


Figure 10 - Séquence et structure de l'aSyn physiologique et agrégée

(A) Représentation des trois sous-domaines traditionnellement distingués au sein de l'aSyn, avec en bleu la partie Nter, orange le domaine NAC et rouge la partie Cter. Sont également indiqués quelques mutations ponctuelles associées à des formes familiales de la MP, et le site de phosphorylation majeur de l'aSyn dans les inclusions de type LBs (Gallegos et al., 2015). (B) Représentation de la structure de l'aSyn quand liée à une membrane incurvée, avec la partie Nter repliée en deux hélices alpha et la partie Cter non repliée (Gallegos et al., 2015). (C) Structure du cœur d'une fibre amyloïde composée d'aSyn, obtenue grâce à des données de cryo-EM. On remarque que ce sont les résidus de la partie NAC et du domaine Nter qui composent le cœur de cette fibre, et qu'on y retrouve une grande partie des mutations ponctuelles liées à des formes familiales de la MP (Guerrero-Ferreira et al., 2018).

2) Isoformes

Il existe quatre isoformes de l'aSyn, formés à partir des 5 exons dans la partie codante du gène *SNCA* et d'un exon dans son segment 5'-UTR (Bungeroth et al., 2014). En plus de la forme majoritaire *SNCA140*, on retrouve les formes alternatives *SNCA126*, *SNCA112* et *SNCA98*. Leur

biologie est encore très peu étudiée, mais leur capacité agrégative semble inférieure à celle de la forme totale. Leur niveau d'expression reste très faible en comparaison de celui de SNCA140, les isoformes minoritaires représentant 0.01 à 2.6% de tous les transcrits d'aSyn dans différentes régions du cerveau humain (Bungeroth et al., 2014).

3) Modifications post-traductionnelles

L'aSyn peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPTs) (Fig 11A & 11B). Elle contient notamment 5 sites de phosphorylation : les principaux sont les résidus sérine S87 et S129, mais les résidus tyrosine Y125, Y133 et Y135 peuvent également être phosphorylés (Fujiwara et al., 2002a; Kahle et al., 2000; Nakamura et al., 2001; Okochi et al., 2000; Pronin et al., 2000). La phosphorylation de ces résidus réduit le potentiel de l'aSyn à s'agréger (Ahn et al., 2002; Chen et al., 2009; Chen and Feany, 2005; Ellis et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Negro et al., 2002; Paleologou et al., 2010; Waxman and Giasson, 2008). Les kinases responsables de la phosphorylation de l'aSyn chez l'humain restent à ce jour indéterminées. Des études *in vitro* et *ex vivo* ont identifié des kinases capables de phosphoryler ces résidus, notamment les caséine kinases I et II (Okochi et al., 2000), les récepteurs couplés aux protéines G 1, 2, 5 et 6 (Pronin et al., 2000) et les polo-like kinases (Inglis et al., 2009; Mbefo et al., 2010) pour le résidu S129. La phosphorylation du résidu S129 est la MPT la plus fréquente de l'aSyn dans les LBs (Anderson et al., 2006), 90% des copies de l'aSyn contenant celle-ci, en comparaison à 4% des formes solubles (Fujiwara et al., 2002a). Cette dernière MPT est également détectable dans des modèles animaux surexprimant l'aSyn (Yamada et al., 2004), ou exprimant une forme pathologique de celle-ci (Neumann et al., 2002). Elle est fréquemment utilisée dans un cadre expérimental pour marquer de façon spécifique l'aSyn agrégée, mais il a été rapporté qu'un des anticorps les plus utilisés générait de forts marquages non spécifiques (Sacino et al., 2014c). Cette MPT diminue l'affinité de l'aSyn pour les membranes, régule son interaction avec les ions métalliques et module sa localisation subcellulaire (Gonçalves and Outeiro, 2017; Kuwahara et al., 2012; Lu et al., 2011). L'effet de cette MPT sur l'agrégation est sujet à de vives controverses (Oueslati et al., 2013).

L'aSyn peut être acétylée à son extrémité Nter, ce qui augmente sa capacité à former des hélices alpha, à interagir avec les membranes et diminue son agrégation (Kang et al., 2012; Maltsev et al., 2012).

L'aSyn peut être SUMOylée à son extrémité Nter, mais le site exact de cette MPT reste à déterminer. L'effet de cette modification est encore sujette à débat, elle pourrait inhiber (Krumova et al., 2011; Shahpasandzadeh et al., 2014) ou augmenter (Kim et al., 2011) l'agrégation. Le rôle de cette MPT pourrait être lié à une modulation de la dégradation de la protéine *via* un recrutement plus ou moins efficace d'ubiquitine ligases. La protéine induisant la SUMOylation de l'aSyn, SUMO1, a été identifiée dans une sous-partie des LBs de patients MP (Rott et al., 2017).

L'aSyn peut également être ubiquitinée, et la détection de l'ubiquitination servait à marquer les LBs avant que leur composition protéique soit éclaircie. Il s'agit en effet dans les LBs de la deuxième MPT de l'aSyn la plus fréquente, après la phosphorylation sur le résidu S129 (Anderson et al., 2006). Les agrégats d'aSyn dans la MSA sont également ubiquitinés (Gai et al., 1998; Gómez-Tortosa et al., 2000; Kuzuhara et al., 1988; Mezey et al., 1998). La majorité des sites d'ubiquitination se situent sur la partie Nter (Nonaka et al., 2005; Rott et al., 2008). Certaines des protéines chargées d'ubiquitiner l'aSyn sont détectées dans les LBs (Bandopadhyay et al., 2005; Liani et al., 2004), où sont liées à des formes familiales de la MP (Leroy et al., 1998; Shimura et al., 2000).

L'aSyn peut être oxydée, notamment par la dopamine (Leong et al., 2009), ce qui induirait son agrégation en oligomères plutôt qu'en agrégats plus massifs, et pourrait sous-tendre la vulnérabilité particulière des neurones dopaminergiques (Pieri et al., 2016b). Les tyrosines de l'aSyn peuvent également subir des nitrations, ce qui favoriserait l'oligomérisation de celle-ci (Giasson et al., 2000; Yamin et al., 2003).

Elle peut également subir des glycations, identifiées dans des LBs (Münch et al., 2000). Le rôle de ces MPTs est encore obscur. Elles semblent cependant favoriser son agrégation pathologique et sa toxicité (Shaikh and Nicholson, 2008; Vicente Miranda et al., 2017).

Quatre résidus sont potentiellement O-glycosylés, sans que l'effet biologique de ces MPTs soit déterminé (Z. Wang et al., 2010).

De nombreux sites de clivage de l'aSyn agrégée ont été décrits, notamment concentrés autour des derniers résidus C terminaux (Pieri et al., 2016a) (Fig 11B). Les formes tronquées en Cter sont détectées dans les LBs, mais représentent une minorité de l'aSyn qui les compose (Anderson et al., 2006; Baba et al., 1998; Liu et al., 2005; Spillantini et al., 1998). La troncation en Cter augmente la propension de l'aSyn à s'agréger (Serpell et al., 2000). La neurosine et la calpaine sont localisées dans les LBs et pourraient donc participer au clivage *in vivo* de l'aSyn (Dufty et al., 2007; Kasai et al., 2008).

Ainsi, l'aSyn est une entité hétérogène et polymorphe. Un rapide calcul nous permet d'estimer qu'il existe de l'ordre de 10000 combinaisons de MPTs potentielles, en combinant celles listées dans (Burré et al., 2018). La plupart de ces MPTs influencent d'une façon ou d'une autre l'agrégation de l'aSyn. Leur abondance relative est sans doute variable selon l'individu, le type cellulaire, le domaine subcellulaire et doit varier de façon dynamique. Ces paramètres cruciaux et difficiles à étudier sont sans doute à la base de différences majeures dans les modalités d'agrégation à chacune de ces échelles.

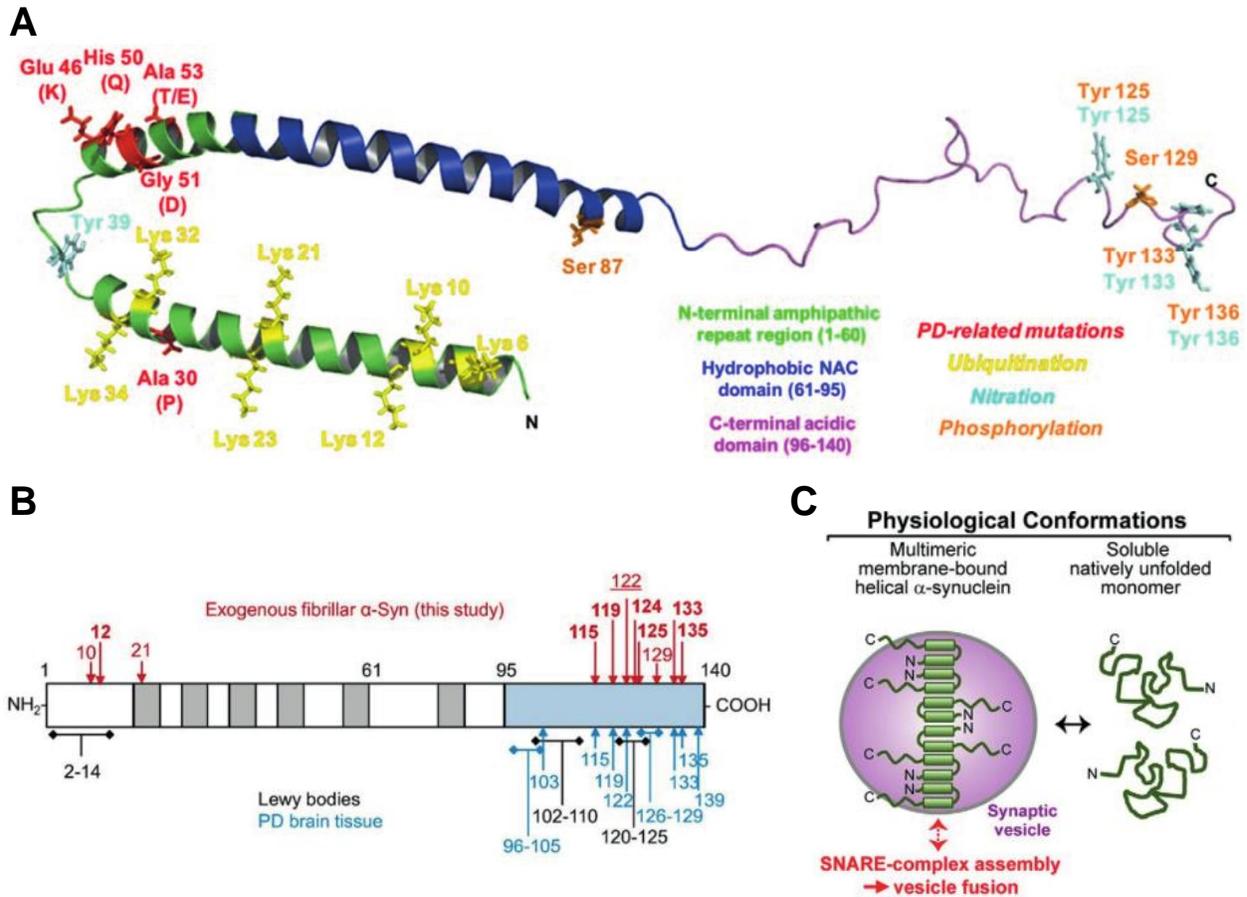


Figure 11 - Plasticité post-traductionnelle de l'aSyn

(A) Modèle de la structure de l'aSyn sous sa forme repliée en association avec les membranes. Sont indiqués en rouges les sites des principales mutations ponctuelles dans la séquence codante de *SNCA* associées à la MP, en jaune les sites d'ubiquitination, en orange les sites de phosphorylation et en cyan les sites de nitration. Les trois domaines traditionnellement distingués au sein de l'aSyn sont également distingués par leur couleur, avec en vert la région Nter, en bleu la région NAC, et en violet la région Cter (Ottolini et al., 2017). (B) Sites de clivages de l'aSyn agrégée identifiés dans des lignées cellulaires humaines exposées à des fibres d'aSyn exogènes (rouge) (Pieri et al., 2016a), dans des extraits de cerveau de patient parkinsonien (bleu) (Kellie et al., 2014; Liu et al., 2005) ou dans des LBs humains (Anderson et al., 2006). (C) Représentation schématique de la plasticité conformationnelle et environnement-dépendante de l'aSyn, dont le repliement et la multimérisation physiologiques sont dépendants de l'association aux vésicules synaptiques (Burré et al., 2015).

4) Structure de l'aSyn et association aux membranes

La structure adoptée par l'aSyn dans la cellule est encore sujette à débat. Il s'agit en effet d'une protéine intrinsèquement désordonnée (PID), qui peut adopter une structure riche en hélices alpha

via son interaction avec certains types de membranes lipidiques (Burré et al., 2013) (Fig 11C). L'aSyn pourrait former des multimères solubles riches en hélices alpha, notamment des tétramères, qui ont été détectés par plusieurs équipes indépendantes (Bartels et al., 2011; Dettmer et al., 2015, 2013; Kim et al., 2011). D'autres équipes n'ont toutefois pas réussi à détecter de telles espèces par purification (Binolfi et al., 2012; Burré et al., 2013; Fauvet et al., 2012), ou par observation directe *in cellulo* (Theillet et al., 2016). La multimérisation physiologique de l'aSyn cytosolique reste donc débattue. L'aSyn pourrait cependant se multimériser en assemblages riches en hélices alpha, de taille indéterminée, grâce à son interaction avec les membranes (Anunciado et al., 2015; Burré et al., 2014; Lee et al., 2002). L'inhibition de l'interaction aSyn-membrane rend son recrutement dans des agrégats pathologiques plus efficace, et augmente les effets toxiques de l'agrégation, ce qui indique un effet protecteur de son interaction avec les membranes (Burré et al., 2015). L'aSyn a une affinité particulière pour certaines compositions de membranes, dont celles des radeaux lipidiques (Fortin et al., 2004; Kubo et al., 2005). Elle modifie activement la composition en lipides des parois avec lesquelles elle interagit, ce qui suggère qu'elle pourrait participer à la formation et à la stabilisation de radeaux lipidiques (Leftin et al., 2013). Elle interagit également avec les acides gras (Sharon et al., 2001), et aurait un rôle dans le métabolisme des lipides (Fanning et al., 2019). Ainsi, des lignées KO pour l'aSyn présentent des changements dans la composition des membranes mitochondriales (Ellis et al., 2005), et dans le métabolisme et la capture des acides gras (Golovko et al., 2007, 2006). Des modifications importantes des compositions des parois lipidiques sont détectées dans des modèles de la MP (Canerina-Amaro et al., 2019). Une étude ultrastructurale de la morphologie neuronale chez des souris surexprimant la forme humaine de l'aSyn a démontré une modification de la taille des boutons synaptiques et la présence de membranes anormales dans ces compartiments, ce qui semble indiquer que l'aSyn puisse modifier profondément la morphologie des membranes (Boassa et al., 2013).

5) Localisation synaptique

L'aSyn est très majoritairement présynaptique dans les neurones matures, ce qui fut observé dès sa première identification en tant que protéine associée aux vésicules synaptiques (Maroteaux et al., 1988), et confirmé par les études suivantes (George et al., 1995; Iwai et al., 1995) (Fig 11). Elle semble être l'une des dernières protéines à atteindre la synapse (Withers et al., 1997), ce qui semble

indiquer un rôle mineur dans la maturation synaptique. Elle joue cependant un rôle de dans la maintenance sur le long terme des structures synaptiques (Chandra et al., 2005; Greten-Harrison et al., 2010). L'aSyn a une forte affinité pour les membranes très incurvées, et donc les vésicules synaptiques qui sont les plus petites vésicules connues dans les neurones (Jensen et al., 2011; Middleton and Rhoades, 2010). L'interaction entre aSyn et vésicules synaptiques pourrait être donc être à la base de la concentration présynaptique de l'aSyn. En effet, quand l'aSyn est exprimée dans des cellules non-neuronales, elle adopte une localisation cytoplasmique, ce qui suggère qu'un élément spécifique des prolongements neuritiques permet sa concentration locale (Huang et al., 2011). Qui plus est, l'activité électrique module la concentration de l'aSyn à la présynapse, ce qui suggère qu'elle se dissocie des vésicules quand celles-ci perdent leur courbure suite à leur fusion à la membrane plasmique, et que la perte de ces sites d'ancrage est suffisante pour perturber la concentration locale de la protéine (Fortin et al., 2005). Des expériences de séparation d'homogénats de cerveau ont toutefois relevé une faible affinité entre aSyn et vésicules, mais ces résultats peuvent être attribués aux protocoles de préparation d'échantillons (Fortin et al., 2004; Kahle et al., 2000). D'autres expériences avec des constructions aSyn-GFP ont permis d'observer que celle-ci était très mobile. Elle l'est cependant moins que la GFP seule, ce qui suggère qu'elle interagit avec des partenaires moléculaires, dont les vésicules synaptiques (Fortin et al., 2004). La mutation de résidus dans la section Nter diminue l'affinité spécifique de l'aSyn pour les membranes incurvées, et résulte en sa redistribution à la membrane plasmique plutôt qu'aux terminaux présynaptiques (Pranke et al., 2011). Alternativement, c'est l'interaction avec les radeaux lipidiques qui pourrait conduire à la localisation synaptique de l'aSyn (Fortin et al., 2004). L'interaction avec les membranes semble donc contrôler la localisation subcellulaire de l'aSyn.

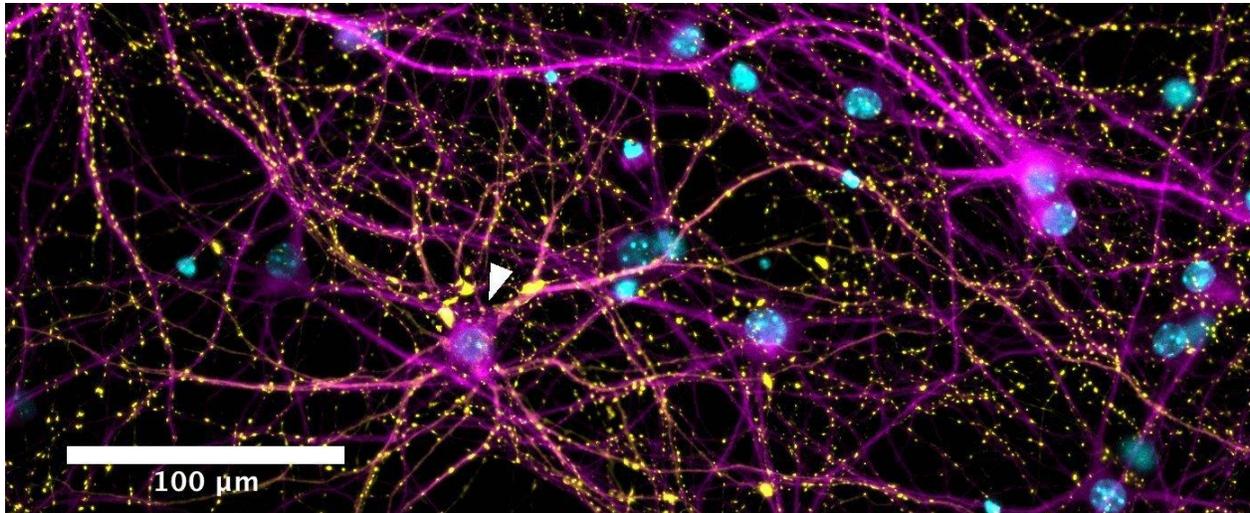


Figure 12 - Localisation majoritairement synaptique de l'aSyn

Le marquage d'une culture primaire mixte de neurones hippocampaux de souris *SNCA*^{+/+} et *SNCA*^{-/-}, dans un ratio de 1 pour 20, permet de clairement visualiser la localisation majoritairement synaptique de l'aSyn trois semaines après la mise en culture des neurones. La flèche indique le seul neurone *SNCA*^{+/+} dans le champ. Magenta:MAP2 ; Cyan:DAPI; Jaune:aSyn. Barre d'échelle : 100um.

6) Rôle synaptique

La localisation majoritairement présynaptique de l'aSyn indique qu'elle y joue un rôle physiologique. Celui-ci est encore incomplètement compris. Un knockout (KO) de l'aSyn induit une augmentation du relargage de dopamine (Abeliovich et al., 2000; Senior et al., 2008; Yavich et al., 2006, 2004), et aurait également un léger effet inhibiteur sur la transmission glutamatergique (Abeliovich et al., 2000; Chandra et al., 2004; Gureviciene et al., 2007). L'impact de l'aSyn sur la biologie de la dopamine offre un lien potentiel entre son agrégation et la vulnérabilité marquée des neurones dopaminergiques dans la MP. Le faible impact du KO de l'aSyn pourrait être dû à une redondance des fonctions des différentes synucléines, dont il existe 3 isoformes (alpha, beta, gamma). En effet, un triple knockout de l'alpha-, la beta- et la gamma-synucléines résulte en une augmentation du relargage de neurotransmetteurs chez la souris (Greten-Harrison et al., 2010). Au niveau synaptique, la surexpression de l'aSyn dans des cellules chromaffines diminue spécifiquement la quantité d'événements de relargage de neurotransmetteurs sans modifier les autres paramètres de neurotransmission, ce qui supporte qu'elle joue un rôle dans la fusion membranaire des vésicules synaptiques (Larsen et al., 2006). Une surexpression modérée à des

niveaux subtoxiques dans des neurones dopaminergiques ou hippocampaux, ainsi que dans des souris transgéniques, provoque une inhibition de l'exocytose synaptique (Nemani 2010). Les vésicules synaptiques s'accumulent ou se dispersent hors de la membrane dans ce contexte selon l'étude (Larsen et al., 2006; Nemani et al., 2010). L'aSyn module la localisation des vésicules synaptiques et leur accumulation dans des sites présynaptiques précis (Diao et al., 2013). Ainsi, l'aSyn module l'activité neuronale, potentiellement en régulant la dynamique des vésicules synaptiques. Cependant, son effet sur l'activité neuronale pourrait être lié à une autre de ses fonctions, celle de protéine chaperonne du complexe SNARE.

Le complexe SNARE permet le relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique en régulant la fusion des vésicules synaptiques à la membrane. L'aSyn fait partie de ce complexe, dans lequel elle joue un rôle de protéine chaperonne, favorisant l'assemblage des différents constituants (Burré et al., 2010). L'impact de l'interaction aSyn-SNARE est contre-intuitif : bien qu'elle favorise le réassemblage rapide du complexe, la surexpression de l'aSyn inhibe de l'activité neuronale (Larsen et al., 2006; Nemani et al., 2010). Une possibilité est que l'aSyn sur-stabilise le complexe SNARE et empêche sa réorganisation rapide dans le cadre d'une stimulation neuronale répétée. L'aSyn pourrait également moduler la fusion des vésicules synaptiques directement *via* son action sur la bicouche lipidique, en modifiant localement sa composition, et cela sans interagir avec le complexe SNARE (DeWitt and Rhoades, 2013). Il semble donc que le rôle fonctionnel de l'aSyn se fasse dans une certaine fourchette optimale de concentrations. L'aSyn pourrait avoir un rôle plus global dans la modulation du trafic vésiculaire, potentiellement *via* son affinité pour les lipides (Cooper et al., 2006; Gitler et al., 2008). L'aSyn joue donc un rôle dans la fonction synaptique, mais sa nature exacte reste ambiguë.

7) Localisation nucléaire

La localisation nucléaire de l'aSyn est elle aussi connue depuis sa description initiale (Maroteaux et al., 1988). Elle a cependant depuis été sujette à débat. Plusieurs études ont en effet reporté une localisation nucléaire de l'aSyn soluble (McLean et al., 2000; Mori et al., 2002; Tanji et al., 2002; Yu et al., 2007) ou agrégée (Lin et al., 2004), mais ce marquage pourrait provenir d'interactions non spécifiques des anticorps utilisés (Huang et al., 2011). Les résultats divergents de ces études

pourraient être liés à la migration progressive de l'aSyn du noyau vers d'autres compartiments au cours du développement (Zhong et al., 2010). L'aSyn peut toutefois réguler l'expression de plusieurs gènes, ce qui suggère un rôle fonctionnel de sa localisation nucléaire (Desplats et al., 2012; Paiva et al., 2017). Sa localisation dans le noyau pourrait modifier son potentiel agrégatif *via* l'interaction avec l'ADN (Cherny et al., 2004; Hegde and Rao, 2007; Padmaraju et al., 2011), ou avec les histones (Jiang et al., 2017). Ainsi, la localisation nucléaire de l'aSyn reste débattue, mais pourrait avoir un impact sur son agrégation. Qui plus est, des agrégats d'aSyn nucléaires sont détectés dans le cerveau de patients atteints de la MSA (Nishie et al., 2004), et peuvent être induits par une exposition à des agrégats exogènes dans des lignées cellulaires (Jiang et al., 2017).

8) Localisation mitochondriale

L'aSyn s'associe aussi aux membranes mitochondriales (Li et al., 2007), et influence la dynamique mitochondriale (Vicario et al., 2018). Inversement, un haut stress oxydatif lié à une forte activité mitochondriale peut provoquer l'oxydation de l'aSyn, qui augmente sa propension à s'agréger (Goodwin et al., 2013). Ainsi, le dialogue entre agrégation pathologique de l'aSyn et dysfonction mitochondriale pourrait constituer une boucle rétroactive, et jouer un rôle dans la vulnérabilité différentielle de certaines populations neuronales (Surmeier et al., 2017).

9) Autres fonctions

Comme la plupart des protéines intrinsèquement désordonnées (PIDs) (Wright and Dyson, 2015), l'aSyn a de nombreux autres rôles cellulaires, moins étudiés. Ainsi, elle régulerait la polymérisation des microtubules (Zhou et al., 2010), l'interaction entre mitochondries et réticulum endoplasmique (Calì et al., 2012), l'architecture du cytosquelette d'actine (Sousa et al., 2009), entre autres. Il pourrait donc s'agir d'une protéine multifonctionnelle, comme la laminine, le récepteur à l'insuline, la galectine 3 ou la PrPc (Krześlak and Lipińska, 2004; Olefsky, 1990; Timpl et al., 1983; Wulf et al., 2017).

10) Dégradation intracellulaire

L'aSyn endogène est dégradée par l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (*chaperone mediated autophagy*, CMA), *via* le motif de reconnaissance $_{95}\text{VKKDQ}_{99}$. Les formes mutantes

A30P et A53T sont résistantes à ce type de dégradation et perturbent les fonctions du CMA, inhibant la dégradation d'autres protéines. Cette inhibition alors compensée par une augmentation de la macroautophagie (Cuervo et al., 2004). L'inhibition de la macroautophagie protège des lignées cellulaires humaines contre l'effet toxique de la surexpression de l'aSyn, en augmentant sa sécrétion associée à des exosomes (Fussi et al., 2018). L'inhibition de la formation d'exosomes dans le même paradigme expérimental augmente la quantité d'aSyn libre (non associée à des exosomes) sécrétée par la cellule. Ainsi, la sécrétion d'espèces pathologiques de l'aSyn pourrait être liée à une dysfonction des mécanismes cellulaires de protéostase.

11) Sécrétion

L'aSyn soluble est sécrétée dans le fluide interstitiel du SNC chez des modèles transgéniques surexprimant l'aSyn (Emmanouilidou et al., 2010), dans le milieu extracellulaire par des cultures primaires neuronales (Paillusson et al., 2013) ou par des lignées cellulaires (Emmanouilidou et al., 2010), et chez les humains dans le LCR, le fluide interstitiel et le plasma (El-Agnaf et al., 2003; Emmanouilidou et al., 2011; Mollenhauer et al., 2012). Dans des lignées, cette sécrétion se fait par exocytose non conventionnelle (Lee et al., 2005). Elle est augmentée par le stress cellulaire, et semble favoriser les formes mal repliées de l'aSyn (Jang et al., 2010; Lee et al., 2013). Cette sécrétion se fait en partie suivant un mécanisme d'exocytose des protéines mal repliées, dépendant de la protéine USP19 et du complexe de protéines chaperonnes DnaJ/Hsp70 (Fontaine et al., 2016; Lee et al., 2016). Dans ce cadre, l'aSyn est d'abord dirigée vers des endosomes tardifs avant d'être sécrétée. L'activité neuronale module également la sécrétion d'aSyn soluble dans des cultures primaires et in vivo (Paillusson et al., 2013; Yamada and Iwatsubo, 2018, p. 201).

De nombreuses études ont détecté la sécrétion d'aSyn en association avec des exosomes dans le milieu extracellulaire de lignées neuronales, un processus qui serait modulé par le manganèse, le calcium, l'inhibition de l'autophagie, des mutations liées à des formes familiales de la MP, ou des dysfonctions lysosomales (Alvarez-Erviti et al., 2011; Emmanouilidou et al., 2010; Fussi et al., 2018; Gustafsson et al., 2018; Harischandra et al., 2019). Le pourcentage de l'aSyn associé à des exosomes dans le sécrétome reste cependant sujet à débat (Danzer et al., 2012; Emmanouilidou et

al., 2010; Fernandes et al., 2016; Tomlinson et al., 2015). L'aSyn est donc sécrétée dans un cadre physiologique par différents modèles, mais le rôle de cette sécrétion reste obscur.

En conclusion, l'aSyn est une protéine multiforme et multifonctionnelle, présente dans de nombreux compartiments cellulaires. Dans le SNC, elle est particulièrement enrichie à la synapse, et pourrait adopter une conformation multimérique physiologique *via* son interaction avec les vésicules lipidiques. L'interaction avec ces vésicules promeut également son changement de conformation d'une PID à une hélice alpha enfouie dans la membrane lipidique. Ces éléments pointent vers un rôle important de l'aSyn à la synapse dans la propagation de son agrégation, et indiquent que la dynamique de ses changements de conformation pourrait avoir un impact important sur son recrutement dans des agrégats pathologiques. L'aSyn est sécrétée de façon constitutive, et ce mécanisme semble favoriser les formes pathologiques de la protéine, ce qui explique peut-être son potentiel de propagation prion-like intercellulaire.

VI) Propagation prion-like de l'aSyn

Pour résumer les chapitres précédents, l'aSyn est une protéine majoritairement présynaptique et soluble qui semble avoir un rôle causal dans la pathogénèse de la MP. L'aSyn peut s'agréger selon des modalités amyloïdes, dont nous avons revu les caractéristiques. L'observation du cerveau de patients à plusieurs stades de progression de la MP permet de mettre en évidence un patron conservé de développement de l'agrégation de l'aSyn, et des greffons neuronaux sains chez des patients de la MP développent des agrégats d'aSyn. Par analogie avec les maladies à prions, l'hypothèse a été faite que l'agrégation de l'aSyn puisse se propager dans les réseaux neuronaux et sous-tende tout ou partie des dysfonctions neuronales dans la MP. Cette hypothèse repose sur deux éléments centraux dont les mécanismes restent incompris : une propagation intercellulaire de l'agrégation, potentiellement trans-synaptique, et une vulnérabilité différentielle des neurones à cette agrégation. Nous allons revoir les éléments de la littérature portant sur la propagation prion-like de l'aSyn, en portant une attention particulière à ces deux éléments.

Pour que l'hypothèse d'une propagation prion-like dans les réseaux neuronaux soit valable, les agrégats d'aSyn doivent pouvoir seeder l'agrégation de l'aSyn soluble, et présenter certaines similarités avec le comportement des agrégats de PrP.

1) Agrégation seedée

L'aSyn recombinante exprimée dans des cultures bactériennes et purifiée forme spontanément des fibres amyloïdes dans certaines conditions de concentration et d'agitation (Bousset et al., 2013a; Luk et al., 2009; Serpell et al., 2000; Wood et al., 1999). Cette conversion ne requière pas les cofacteurs polyanioniques nécessaires pour la PrP. Ces fibres préformées (*preformed fibrils*, PFFs) présentent l'intérêt d'être uniquement constituées d'aSyn : les conséquences d'une exposition à des PFFs ne découlent que des protéines agrégées et non d'autres facteurs présents dans des homogénats de tissu (protéines, lipides, acides nucléiques...). Cependant, des différences dans les méthodes de préparation peuvent mener à la génération d'agrégats aux propriétés divergentes (Bousset et al., 2013b; Guo et al., 2013; Peelaerts et al., 2015). Ces polymorphes sont décrits plus en détail dans le paragraphe suivant. Cette propriété introduit cependant un frein majeur à la comparaison des

résultats d'études faisant usage d'agrégats faiblement caractérisés. Dans le cadre de mes expériences, j'ai utilisé des agrégats d'aSyn caractérisés par l'équipe de Ronald Melki (Ghee et al., 2005). L'exposition de lignées cellulaires surexprimant l'aSyn à des PFFs provoque l'accumulation de l'aSyn endogène en des inclusions qui récapitulent plusieurs caractéristiques des corps de Lewy : insolubilité, résistance à la dégradation, hyperphosphorylation et ubiquitination (Luk et al., 2009; Tanik et al., 2013). Cette observation a été répliquée dans des cultures primaires wild-type (WT) (Volpicelli-Daley et al., 2011), et dans des modèles animaux non transgéniques (Luk et al., 2012a) (Fig 13). L'agrégation de l'aSyn peut donc se propager dans un contexte biologique. D'autres éléments la rapprochent des maladies à prion, notamment l'existence de polymorphes d'agrégats.

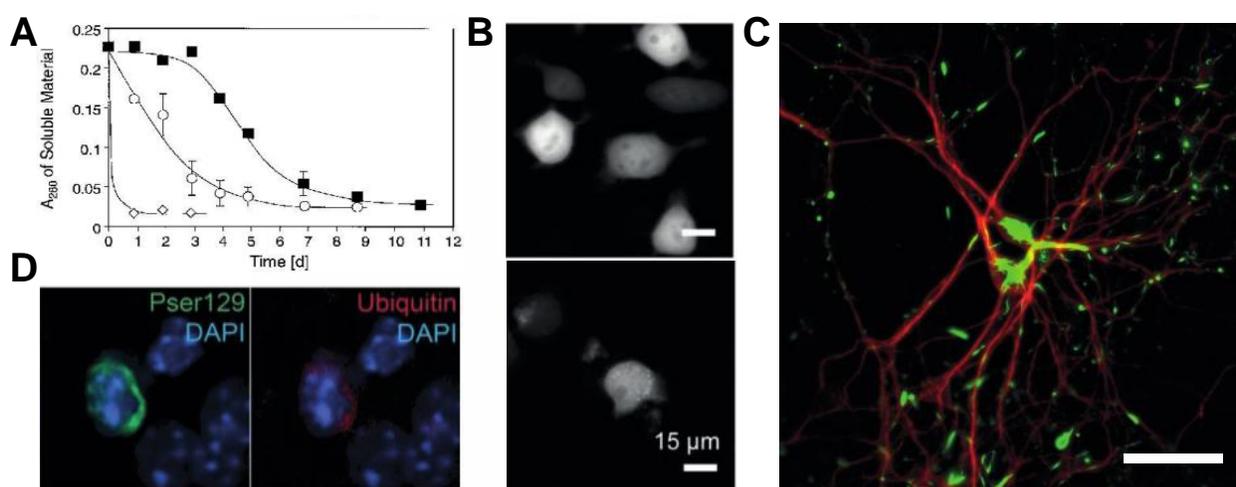


Figure 13 - Agrégation seedée de l'aSyn dans plusieurs modèles

(A) Agrégation d'aSyn purifiée *ex cellulo* au cours du temps. La quantité de matériel soluble est indiquée sur l'axe des ordonnées, mesurée grâce à l'absorption optique de la solution à 280nm. Le temps d'incubation en jours est indiqué sur l'axe des abscisses. La ligne composée de carrés pleins correspond à l'agrégation spontanée de l'aSyn, une phase de délai étant observable pendant les 2 premiers jours. Les deux autres lignes correspondent à l'agrégation de l'aSyn en présence d'agrégats préformés introduits à hauteur de 1% ou 10% de la concentration d'aSyn soluble, ces deux conditions sont indiquées respectivement par les cercles vides et les losanges vides. On peut noter que la phase de délai est absente et que l'agrégation se fait bien plus rapidement dans ces conditions (Wood et al., 1999). (B) Induction de l'agrégation d'une construction chimérique d'aSyn fluorescente exprimée par des lignées cellulaires Neuro2A suite à l'exposition à des fibres d'aSyn préformées (PFFs). En haut : condition contrôle, en bas : condition exposée. On note l'apparition d'un signal ponctiforme, signe de l'agrégation de l'aSyn (Pieri et al., 2016b). (C) Induction de l'agrégation de l'aSyn dans des cultures primaires hippocampales murines, 2 semaines après l'exposition à des PFFs. Rouge:MAP2 ; Vert:aSyn phosphorylée. Barre d'échelle : 50um. (D) Induction de l'agrégation de l'aSyn *in vivo* dans le noyau antérieur olfactif après

injection de PFFs dans le bulbe olfactif. Bleu:DAPI ; Rouge:Ubiquitine ; Vert:pSyn (Rey et al., 2016).

2) Polymorphes

Une des caractéristiques principales des processus prions est l'existence de souches. Les souches sont des assemblages autopropagatifs ayant des propriétés biologiques distinctes mais formés à partir d'une même protéine. Ne différant que par leur assemblage tridimensionnel, il s'agit de polymorphes structuraux. Les souches de prions conservent leurs propriétés biologiques de façon stable après des passages sériés dans des modèles animaux ou des cultures cellulaires (Collinge, 2016). L'existence de polymorphes structuraux d'aSyn est attestée *in vivo* et *in vitro*, et pourrait expliquer la variété des synucléinopathies, et notamment distinguer la MSA de la MP (Melki, 2018). En effet, des agrégats formés à partir d'aSyn recombinantes peuvent avoir des activités biologiques distinctes.

Les agrégats d'aSyn isolés à partir de GCIs chez des patients atteints de la MSA présentent de nombreuses caractéristiques biochimiques qui les distinguent des LBs isolés chez des patients atteints de DLB. Ils n'ont pas le même profil de digestion par la protéinase K et de phosphorylation, et ne sont pas marqués par les mêmes anticorps ciblant différentes conformations de l'aSyn. Ces éléments indiquent que leur conformation tridimensionnelle diffère. Qui plus est, ils n'ont pas la même capacité à induire l'agrégation dans des cultures cellulaires. Cette divergence semble être due à l'impact de l'environnement intracellulaire des oligodendrocytes, ces derniers générant des agrégats de types GCIs quand exposés aux agrégats de type LBs. Ainsi, les agrégats gliaux de la MSA et neuronaux de la MP sont deux polymorphes structuraux d'agrégats d'aSyn (Peng et al., 2018). *In vitro*, l'équipe de Ronald Melki a pu générer des agrégats d'aSyn recombinante dont la structure et l'activité biologique diffèrent, en incubant l'aSyn monomérique dans des tampons de compositions distinctes, ce qui supporte l'importance de l'environnement dans la génération de polymorphes. Ces agrégats présentent des caractéristiques physiques spécifiques, le polymorphe "Fibrils" présentant des caractéristiques amyloïdes tandis que le polymorphe "Ribbons" n'a pas une structure amyloïde, et les espèces générées par leur digestion à la PK diffèrent (Fig 14). Ces caractéristiques structurales se propagent lors de l'incubation des polymorphes avec de l'aSyn soluble dans le tampon approprié. Ils diffèrent par leur toxicité, leur propension à se lier aux

membranes et leur capacité à déclencher l'agrégation de l'aSyn soluble *in vitro* et *in vivo* (Bousset et al., 2013b; Gribaudo et al., 2019; Peelaerts et al., 2015). De façon intrigante, seules les "Ribbons" provoquent l'apparition d'aSyn phosphorylée dans les oligodendrocytes, ce qui suggère que ces agrégats se rapprochent de ceux présents dans le cerveau des patients atteints de la MSA (Peelaerts et al., 2015). Ils ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique avec la même efficacité, mais se propagent avec la même efficacité dans des réseaux de neurones reconstruits *in vitro* (Gribaudo et al., 2019). Ces éléments indiquent qu'il s'agit de deux polymorphes aux propriétés biologiques distinctes. Des agrégats d'aSyn distincts peuvent également être générés selon le temps d'incubation de l'aSyn recombinante sous agitation, et diffèrent de par leur capacité à seeder l'agrégation de tau en plus de celle de l'aSyn (Guo et al., 2013). Ainsi, l'environnement dans lequel s'agrège l'aSyn peut mener à la génération de polymorphes distincts, dont les caractéristiques biochimiques et l'activité biologique diffèrent.

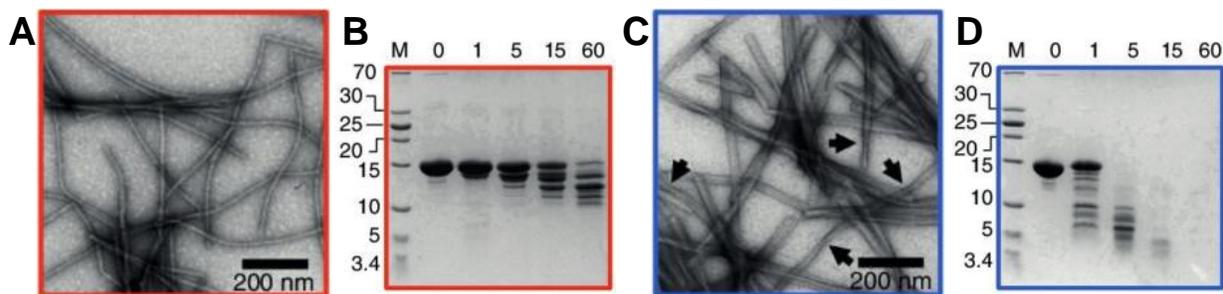


Figure 14 - Polymorphes structuraux d'agrégats d'aSyn

(A) et (C) : images en microscopie électronique des polymorphes "Fibrils" et "Ribbons", respectivement, générés par l'équipe de Ronald Melki. Les flèches indiquent les torsions des fibres propres au polymorphe "Ribbons". (B) et (D) Spectre de digestion par la protéinase K (PK) des deux polymorphes. Les deux polymorphes diffèrent par le poids des espèces moléculaires générées par la digestion et la résistance à la digestion au cours du temps. A droite sont indiqués les poids moléculaires en kDa, et en haut la durée de la digestion en minutes. (Bousset et al., 2013b). Barre d'échelle : 200nm.

Une caractéristique des souches dans les maladies à prions est qu'elles conservent leurs caractéristiques biologiques au cours de transmissions sériées dans des animaux. Cette propriété a été mise en évidence pour la première fois par l'équipe de Prusiner en 2019. Les auteurs ont observé que des agrégats extraits de deux patients atteints de la MSA pouvaient être propagés dans des souris transgéniques exprimant une ou deux copies de l'aSyn A53T humaine sous le contrôle du promoteur de *SNCA*. L'injection chez ces animaux provoque des symptômes distincts selon

l'homozygotie de ceux-ci. L'injection d'homogénats cérébraux d'une homozygote ayant subi une injection de MSA à une hétérozygote, ou inversement d'homogénats cérébraux d'une hétérozygote injectée par du matériel de patient à une homozygote provoque les mêmes effets qu'une injection directe du matériel des patients. Qui plus est, les homogénats cérébraux de souris injectées avec les extraits de cerveau de patients présentent le même spectre d'initiation de l'agrégation de différents mutants d'aSyn que les extraits de cerveau de patients. Ces éléments supportent donc le fait que les agrégats extraits du cerveau de patients MSA peuvent être transmis de façon sériée dans des animaux de fond génétique distinct tout en conservant leurs capacités biologiques propres (Woerman et al., 2019).

Ainsi, les données expérimentales disponibles supportent fortement une propagation de l'agrégation de l'aSyn selon des modalités comparables à celle de l'agrégation de la PrP. Les mécanismes sous-tendant la propagation intercellulaire de ce processus restent cependant mal compris.

VII) Etapes d'une propagation prion-like

La propagation intercellulaire de l'agrégation de l'aSyn peut être séparée en plusieurs étapes : initiation de l'agrégation, propagation de l'agrégation à l'aSyn soluble, transport axonal, sécrétion, liaison à la membrane extracellulaire, internalisation, résistance partielle aux mécanismes de dégradation intracellulaire puis accès au cytosol et propagation de l'agrégation de l'aSyn. Chacun de ces processus peut varier de cellule à cellule, et donc influencer la propagation prion-like de l'aSyn dans un tissu complexe. Les différences locales de l'efficacité de chacun de ces mécanismes influencent donc le patron de propagation de l'agrégation dans le SNC, et pourraient être à la base de schémas conservés de développement de l'agrégation tels que le staging de Braak.

1) Initiation de l'agrégation

Les causes du déclenchement initial de l'agrégation prion-like de l'aSyn ne sont pas connues. Au niveau moléculaire, la nucléation primaire démarre probablement par la génération d'un noyau non organisé, peut-être favorisée par les propriétés de PID de l'aSyn (Aguzzi and Altmeyer, 2016; Ray et al., 2019; Uversky, 2017) (Uversky VN 2017, Ray 2019 bioRxiv, Aguzzi Trends 2016). Ce noyau se réorganise ensuite en fibre amyloïde et propage sa structure aux protéines solubles (Auer et al., 2008). La nucléation primaire est stochastique, mais peut être favorisée par une augmentation locale de la concentration d'aSyn (Jarrett and Lansbury, 1993) et par certaines MPTs évoquées plus tôt. La probabilité d'une nucléation primaire est directement liée au volume du système étudié (Eisenberg and Jucker, 2012), on pourrait donc supposer que le volume du cerveau humain est un facteur de risque direct. Cependant, aucune trace de dépôt d'amyloïde n'a été détectée chez les éléphants, dont le cerveau est trois fois plus volumineux que le nôtre (Cole and Neal, 1990). La quantité d'études à ce sujet reste toutefois limitée.

Les facteurs de risque connus permettent de proposer des mécanismes de déclenchement chez les patients. L'âge est un des facteurs de risque majeurs, et est associé à une diminution de l'efficacité de la dégradation des protéines défectueuses (Klaips et al., 2018). Si le repliement et l'agrégation pathologiques de l'aSyn surviennent de façon stochastique, alors la diminution de l'efficacité de la protéostase pourrait permettre à des conformères anormaux ou à des oligomères de persister dans

l'environnement intracellulaire plus que de normal. Un des facteurs de risque génétiques les plus connus est le niveau d'expression de l'aSyn (Ibáñez et al., 2004; Singleton et al., 2003). Il se pourrait que des mutations dans des voies de signalisation affectant le niveau d'expression de l'aSyn soient présentes dans certains cas sporadiques de MP, sans signature détectable par les études d'association pangénomiques (*genome wide association studies*, GWAS). Un autre mécanisme d'origine génétique échappant à la détection par des GWAS est le mosaïcisme cellulaire. En effet, les neurones du SNC peuvent présenter des de fortes hétérogénéités dans leur génome, avec des régions entières dupliquées ou supprimées (McConnell et al., 2013). Ainsi, la surexpression locale de l'aSyn par un ou plusieurs neurones pourrait mener à sa nucléation, puis à la propagation de son état agrégé dans le SNC. Qui plus est, il a récemment été démontré que les patients atteints de MA sporadique ont une hétérogénéité génétique des tissus nerveux plus importante que les patients sains (Lee et al., 2018). Ainsi, des mutations dans les voies de contrôlant la magnitude du mosaïcisme neuronal pourraient être responsables d'une partie des cas sporadiques de MP et de MA. Ces mécanismes pourraient expliquer certains dépôts atypiques de LBs.

La MP a de nombreux facteurs de risque environnementaux, qui pourraient être à l'origine de la nucléation de l'aSyn. L'exposition à certains pesticides augmente significativement le risque de développer la MP (Baltazar et al., 2014; Gunnarsson and Bodin, 2017; Stykel et al., 2018), tout comme l'exposition aux métaux lourds (Bjorklund et al., 2018; Uversky et al., 2001b). Une forte consommation de produits laitiers augmente également le risque de développer la maladie (Hughes et al., 2017; Jiang et al., 2014), potentiellement *via* l'exposition à des exosomes non détruits par le processus de pasteurisation (Melnik and Schmitz, 2019). Des perturbations du microbiote intestinal ont été associées à la MP (Heintz-Buschart et al., 2018; Scheperjans, 2018), bien que de façon controversée (Chung et al., 2016). Le niveau d'expression de l'aSyn est augmenté par certaines infections, suggérant un rôle de cette protéine dans des réactions immunitaires (Barrenschee et al., 2017; Killinger et al., 2018; Stolzenberg et al., 2017). Qui plus est, des bactéries envahissent parfois les tissus nerveux humains (Dominy et al., 2019; Mawanda and Wallace, 2013). Plus récemment, des éléments supportant une relation causale entre l'infection à *Porphyromonas gingivalis* et la pathogénèse de la MA ont été avancés (Dominy et al., 2019). De nombreux éléments mettent en causes les infections virales et bactériennes dans la pathogénèse de la MA, notamment *via*

l'inflammation des tissus nerveux (Itzhaki et al., 2016). Le virus HSV-1, dont Hawkes et collègues avaient noté la similarité du patron d'invasion du SNC avec le patron de propagation de l'aSyn a été lui aussi associé à la pathogénèse de la MA. En effet, *via* sa corona, une couche de protéines virus-spécifiques entourant les particules infectieuses, il déclenche l'agrégation de fragments d'Abeta, putativement *via* leur surconcentration locale (Ezzat et al., 2019; Hawkes et al., 2007). Il pourrait donc également déclencher l'agrégation de l'aSyn, ce qui reviendrait à vérifier l'hypothèse virale avancée par l'équipe de Braak pour expliquer la propagation de l'agrégation avant l'hypothèse prion-like.

Il existe donc de nombreuses hypothèses au déclenchement de l'agrégation, qui pourrait se faire dans le SNC ou en périphérie. On peut noter que les facteurs augmentant le risque de déclencher l'agrégation initiale augmentent également l'efficacité de la propagation de l'agrégation.

2) Propagation de l'agrégation à l'aSyn soluble

La propagation de l'agrégation de l'aSyn se fait au niveau moléculaire selon des modalités communes aux amyloïdes : élongation/fragmentation (Wood et al., 1999). La cinétique de chacun de ces deux processus est près de 10,000 fois plus lente pour l'aSyn que pour la PrP (Sang et al., 2018). Elle pourrait être favorisée dans certains compartiments cellulaires, dans lesquels l'aSyn est dénaturée par des conditions de pH particulières (Lee et al., 2005), dans lesquels sa concentration est élevée, comme les synapses, ou dans lesquels l'aSyn n'est pas associée aux membranes, cette interaction semblant limiter l'agrégation de l'aSyn (Burré et al., 2013). Certaines MPTs inégalement représentées dans des cellules ou des compartiments subcellulaires peuvent également moduler ce processus. Les présynapses sont particulièrement enrichies en aSyn soluble, ce qui supporte une propagation trans-synaptique rétrograde. L'internalisation à la présynapse d'un agrégat seedant serait en effet directement suivie par le recrutement efficace de l'aSyn dans les agrégats, la cinétique de ce phénomène étant lié à la concentration des protéines solubles, et ce processus pourrait ainsi échapper plus facilement aux mécanismes de contrôle de l'homéostasie protéique. Une direction préférentielle du transfert de l'agrégation de l'aSyn dans les réseaux de neurones reste cependant hypothétique. Les lipides peuvent également moduler l'agrégation de l'aSyn (Burré et al., 2014;

Galvagnion et al., 2016, 2015). L'accumulation anormale de lipides, ou une dysfonction du métabolisme lipidique pourraient donc moduler l'agrégation de l'aSyn.

Le niveau d'expression de l'aSyn pourrait modifier la vulnérabilité de populations neuronales à l'agrégation de celle-ci (Wood et al., 1999). Les systèmes cellulaires sont cependant plus complexes, et de nombreux autres facteurs pourraient impacter ce phénomène. Ainsi, dans les maladies à prions, le taux d'expression de la PrP^C ne permet pas d'inférer l'accumulation de PrP^{Sc} dans les organes, ce qui indique que d'autres facteurs modulent la vulnérabilité des cellules (Glatzel and Aguzzi, 2000). Plusieurs études indiquent cependant que le niveau d'expression de l'aSyn pourrait influencer la vulnérabilité des neurones à l'agrégation (Erskine et al., 2018; Luna et al., 2018; Taguchi et al., 2018, 2016, 2014), mais ce paramètre n'a été abordé expérimentalement *in cellulo* que récemment, dans une publication préparée pendant ma thèse qui est présentée dans la partie résultats.

Comme pour les maladies à prions, il existe une barrière d'espèce entre formes murine et humaine de l'aSyn, qui reste cependant mal documentée à l'heure actuelle. Cette barrière est franchissable, des fibres d'aSyn humaine pouvant seeder l'agrégation de l'aSyn murine *in vitro* ou *in cellulo*, cependant avec une efficacité moindre, et inversement les fibres murines seedent moins efficacement l'agrégation de l'aSyn humaine soluble (Luk et al., 2016). Les formes mutantes de l'aSyn humaine telles que A53T sont plus facilement seedables par des fibres murines, ce qui peut s'expliquer pour cette mutation précise par la présence naturelle d'une thréonine en position 53 dans l'aSyn murine. La double expression des formes humaine et murine de l'aSyn réduit l'agrégation de la première après exposition à des fibres humaines, suggérant des phénomènes d'interférence (Fares et al., 2016). Ces résultats indiquent donc qu'une attention particulière doit être portée au choix des agrégats utilisés, et au fond génétique du modèle dans lequel ces fibres sont introduites.

La propagation de l'agrégation de l'aSyn génère une quantité d'espèces de tailles variées, et certaines d'entre elles ont été relativement ignorées jusqu'il y a peu.

3) Oligomères

Les LBs pourraient n'avoir qu'un rôle limité dans la pathogénèse de la MP, et ne représenter qu'un état final et stabilisé d'agrégats d'aSyn (Caughey and Lansbury, 2003). En effet, des espèces intermédiaires d'aSyn multimériques sont générées au cours de l'agrégation, dont des espèces oligomériques de petite taille riches en hélices alpha (Auer et al., 2008; Ghosh et al., 2015). Ces espèces sont moins facilement détectables que les LBs, mais certaines avancées méthodologiques (notamment la technique de *proximity ligation assay*) ont permis de mettre en évidence leur présence massive dans le cerveau de patients, et ce dans des zones ne contenant habituellement pas de LBs (Roberts et al., 2015)). Certaines mutations familiales dans *SNCA* causant la MP résultent en une augmentation de la formation d'espèces intermédiaires, des protofibres sphériques dans le cas de la mutation A30P (Conway et al., 2000, 1998). Ces protofibres ont une haute affinité pour les membranes plasmiques (Ding et al., 2002; Volles et al., 2001), et perméabilisent des membranes artificielles (Volles et al., 2001; Volles and Lansbury, 2002). Ces protofibres sont générées en amont des fibres et provoquent des dysfonctions cellulaires (Gosavi et al., 2002). Une autre étude a cependant montré que des oligomères d'aSyn préfibrillaires instables (constitués en moyenne de 30 monomères) ont moins d'affinité pour les membranes, une moins forte capacité à seeder l'aSyn soluble et une moindre propension à perméabiliser les membranes que des espèces fibrillaires de plus grande taille (8300 monomères) (Pieri et al., 2016b). La comparaison d'espèces oligomériques stabilisées de tailles variées démontre que les plus grandes espèces ont une plus grande capacité à seeder l'agrégation de l'aSyn soluble. Les oligomères se propagent toutefois dans les réseaux neuronaux avec une plus grande rapidité que les espèces fibrillaires (Rey et al., 2013). La comparaison des effets d'espèces oligomériques entre études est toutefois limitée par la variabilité que peuvent induire les protocoles de préparation (Danzer et al., 2007). L'expression d'aSyn portant des mutations favorisant la formation d'oligomères et inhibant la formation de fibres riches en feuillets beta génère une forte toxicité cellulaire, tandis qu'une forme tronquée de l'aSyn favorisant la formation de fibres ne provoque pas de dégénérescence (Karpinar et al., 2009; Winner et al., 2011, p. 200). La dopamine stabilise des oligomères de petite taille, apportant une base rationnelle à la vulnérabilité accrue des neurones dopaminergiques (Cappai et al., 2005; Lee et al., 2011; Mazzulli et al., 2006; Pieri et al., 2016b). Les protocoles d'injection de PFFs chez les

animaux requièrent la sonication des agrégats d'aSyn, et de nombreuses autres études supportent le fait que les espèces de petites tailles soient les plus mobiles (Helwig et al., 2016; Luk et al., 2012a; Rey et al., 2013). Cependant, certaines espèces oligomériques n'induisent pas de seeding, ce qui suggère que plusieurs modalités de multimérisation de l'aSyn sont possibles, et que ces voies d'agrégation engendrent des propriétés biologiques distinctes (Fagerqvist et al., 2013). Les capacités toxiques et le moins fort potentiel de seeding des oligomères au regard des espèces de plus haute taille pourraient également permettre un parallèle avec la PrP^I mise en évidence par l'équipe de Collinge.

4) Propagation dans des modèles animaux transgéniques

La propagation de l'agrégation de l'aSyn a pu être mise en évidence dans plusieurs modèles animaux. Les premières études de ce genre ont utilisé des souris mutantes surexprimant la forme pathologique A53T de l'aSyn humaine. Ces souris, les TgM83, développent spontanément des inclusions d'aSyn quand le transgène est exprimé de façon hétérozygote ou homozygote. L'injection de PFFs, d'homogénats de cerveau de vieilles souris ou d'extraits de cerveau de patients atteints de la MSA accélère considérablement le développement des inclusions dans ce modèle, et provoque une mort précoce de ces souris (Bétemps et al., 2014; Luk et al., 2012b; Mougenot et al., 2012; Watts et al., 2013). Ces observations supportent la nucléation de l'aSyn par des agrégats pré-formés, et donc sa propagation prion-like au sein du SNC. Cependant, l'injection d'homogénats cérébraux de souris saine non mutante provoque également l'agrégation de l'aSyn chez les TgM83 (Sacino et al., 2016), ce qui suggère que d'autres facteurs que les agrégats d'aSyn puissent être à l'origine de l'accélération de la pathologie dans ce modèle. Par exemple, une saturation des systèmes de dégradation protéiques par le matériel injecté pourrait déclencher l'agrégation de l'aSyn exprimée par la souris en perturbant la dégradation. Qui plus est, les TgM83 expriment la protéine sous le contrôle du promoteur de PRNP, donc à un fort niveau d'expression et de façon ectopique dans les cellules gliales en plus des neurones, ce qui induit dans leurs tissus cérébraux l'apparition d'agrégats astrocytaires habituellement absents dans la MP (Sacino et al., 2014a). La répartition des agrégats dans le cerveau des souris inoculées ne diffère cependant pas de celle présente dans les TgM83 développant spontanément des LBs quel que soit le site d'injection intra-SNC (Bétemps et al., 2014; Uchiyama and Giasson, 2016; Watts et al., 2013). De plus, l'injection intracérébrale d'inoculats

distincts tels que des extraits cérébraux de patients atteints de la MSA ainsi que des PFF provoque une pathologie dont la répartition et les caractéristiques immunohistochimiques sont très similaires (Dhillon et al., 2019). Ainsi, les caractéristiques intrinsèques des TgM83 semblent dominer les variations dans la répartition intracérébrale de la pathologie que l'on pourrait attendre en faisant varier le site d'injection ou l'inoculat.

Bien que les études réalisées dans des modèles animaux transgéniques de type TgM83 ait supporté que l'aSyn ait un comportement prion-like, les résultats des expériences réalisées avec ce modèle restent difficiles à interpréter.

5) Propagation dans des modèles animaux wild-type

L'injection intracérébrale de PFF dans des animaux WT permet d'étudier de façon spécifique le seeding sans que la susceptibilité du modèle ait été artificiellement augmentée. Ce protocole expérimental provoque l'agrégation de l'aSyn endogène, qui reste d'abord circonscrite au site d'injection (Luk et al., 2012a), puis s'étend à d'autres régions, connectées directement ou indirectement au site d'injection (Rey et al., 2016). Varier le site d'injection modifie les zones vers lesquelles se propage l'agrégation, un mois après celle-ci : tandis qu'une injection dans la SN génère des inclusions majoritairement circonscrites à cette région, une injection dans le striatum est suivie de l'apparition d'inclusions dans l'amygdale, la SNpc et certaines régions corticales, et une injection dans le cortex entorhinal provoque l'apparition d'inclusions dans l'hippocampe, en sus du site d'injection lui-même (Masuda-Suzukake et al., 2014) (Fig 15B). La relation entre le patron spatial de développement des inclusions et le site d'injection supporte que l'agrégation se propage en suivant les réseaux neuronaux, et n'est pas uniquement gouvernée par le tropisme cellulaire des agrégats injectés. Certaines études ne parviennent cependant pas à déclencher une agrégation consécutive de l'aSyn endogène *via* l'injection de PFF (Sacino et al., 2014b). Ces résultats pourraient être attribués à une différence dans la préparation des PFF (Polinski et al., 2018). Une série de 3 publications permet d'établir un scénario des événements suivant une injection de PFF dans le bulbe olfactif de souris WT. Dans la première, l'injection de PFF d'aSyn humaine dans des souris WT a permis de suivre la dissémination de celles-ci : les assemblages de petite taille (oligomères) et les monomères d'aSyn se déplacent rapidement, et atteignent des régions cérébrales distantes et

directement connectées au bulbe olfactif en 1h30 (Rey et al., 2013) (Fig 15A). Cependant, les assemblages de plus grande taille (fibres), dont le potentiel de seeding de l'aSyn soluble est plus élevé (Pieri et al., 2016b), restent confinés au site d'injection au cours des 3j suivant l'injection. Deux autres publications ont été réalisées par le même auteur, suivant le même protocole d'injection mais avec des PFF d'une autre origine, non taggées, et ont permis de suivre le développement des agrégats d'aSyn endogène sur le plus long terme : de 1 à 23 mois post-injection. Les auteurs notent que sur les 12 mois qui suivent l'injection, de nombreuses régions développent des agrégats d'aSyn, avec une implication croissante de régions de plus en plus nombreuses et une quantité croissante d'agrégats (Rey et al., 2016). On peut noter que les régions auxquelles s'étaient propagés les oligomères de la première étude présentent toutes des inclusions. Cependant, la troisième étude, réalisée sur des animaux injectés au même stade que dans l'étude précédente, indique un changement de tendance. En effet, les auteurs notent qu'à 18 mois, de nouvelles régions présentent des agrégats, mais que les régions précédemment touchées contiennent de moins en moins d'inclusions. A 23 mois, le nombre de régions touchées diminue et la pathologie régresse dans presque toutes les régions (Rey et al., 2018) (Fig 15C). On peut donc dessiner un scénario en 3 phases dans ce cadre expérimental, en assumant que les assemblages d'aSyn distincts soient comparables : 1) une propagation rapide de certains agrégats initiaux, potentiellement à des régions plus lointaines que celles détectées dans la première étude, mais sous le seuil de détection, 2) l'agrégation de l'aSyn endogène par seeding, les agrégats générés dans ce processus pouvant se propager ou non aux régions connectée, et 3) une diminution de la quantité d'inclusions. Ces études mettent en valeur l'importance des facteurs intrinsèques aux régions cérébrales en sus de leur connectivité : par exemple, le cortex pédonculaire dorsal ne développe des inclusions que 18 mois après exposition aux PFF, bien qu'il soit directement connecté au site d'injection, tandis que l'hippocampe, connecté indirectement au site d'injection, en développe dès 6 mois après exposition. Il faut également noter que dans ces trois études, la propagation aux sites directement connectés peut être la résultante 1) dans le cas d'une propagation antérograde, de la présence d'agrégats dans les axones provenant de la région directement exposée, ou 2) dans le cas d'une propagation rétrograde, de l'exposition directe des axones de cette région aux PFF injectés. En effet, une zone est positive quelque soit la localisation (neuritique ou somatique) des inclusions dans celle-ci. Cependant, la présence d'inclusions dans des régions indirectement connectées au site d'injection

suggère qu'il y a effectivement propagation interneuronale. On peut supposer que les agrégats initiaux, après s'être disséminés, induisent ou non un phénomène lent d'agrégation de l'aSyn endogène, dont l'importance dépend de la région touchée, puis sont dégradés. En effet, certains auteurs rapportent que les agrégats initialement injectés dans des souris WT ne sont plus détectables 1 semaine après injection (Masuda-Suzukake et al., 2013). D'autres rapportent sa persistance 1 mois et demi après injection, mais dans un cadre expérimental ou des doses massives de PFF ont été injectées toutes les deux semaines pendant 3 mois (Peelaerts et al., 2015).

En conclusion, les études réalisées dans des animaux WT supportent une propagation trans-neuronale de l'agrégation, et suggèrent un scénario en 3 phases *in vivo*. Cependant, l'étude des mécanismes de cette propagation (transport rétrograde ou antérograde, impact du poids synaptique sur la propagation, modulation de la propagation par la vulnérabilité intrinsèque de certaines régions) y est difficile, de par la complexité des connexions dans le cerveau des mammifères. Ces études indiquent également que chez des animaux WT, la propagation de l'agrégation est plus lente que chez les animaux transgéniques, et ne se perpétue pas indéfiniment. Celle-ci semble au contraire s'atténuer avec le temps. Cette observation contraste avec le scénario prion-like chez les patients humains, selon lequel l'agrégation se propagerait sur plusieurs dizaines d'années en s'aggravant avec le temps, et suggère que le fond génétique des patients pourrait être important dans la perpétuation de l'agrégation prion-like.

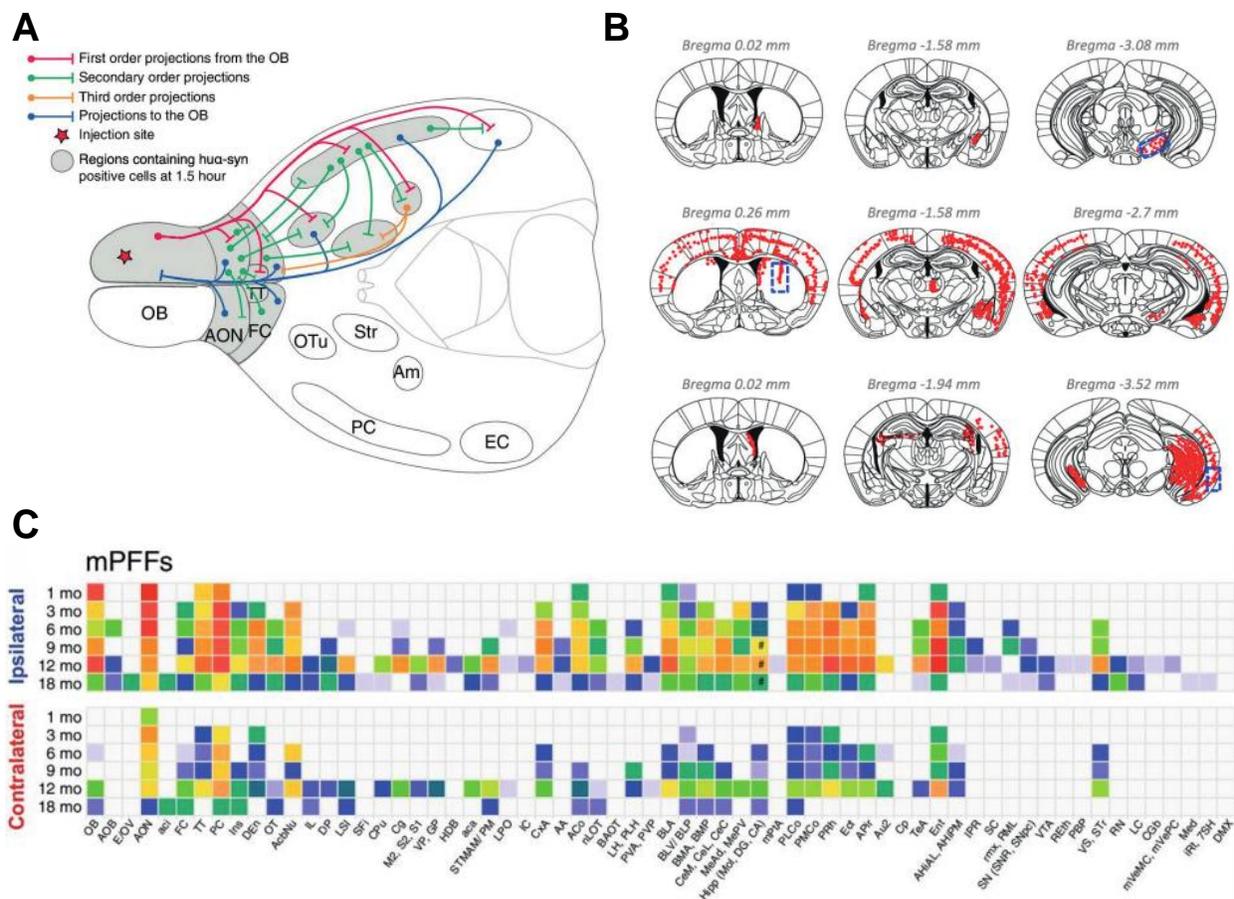


Figure 15 - Propagation de l'agrégation après injection intracérébrale de PFF d'aSyn chez des souris WT

(A) L'injection intracérébrale d'oligomères d'aSyn chez la souris est suivie de leur dissémination rapide (1.5h) à certaines régions interconnectées au site d'injection, ici le bulbe olfactif (Rey et al., 2013). (B) Chez la souris, les régions dans lesquelles se développent des agrégats d'aSyn dépendent du site d'injection, suggérant que la propagation de l'agrégation est dépendante de l'architecture du réseau neuronal. Ligne du haut : injection dans la substantia nigra ; milieu : injection dans le striatum ; bas : injection dans le cortex enthorinal (Masuda-Suzukake et al., 2014). (C) Après injection de PFFs dans le bulbe olfactif de souris WT, la quantité d'inclusions augmente pendant les 12 premiers mois dans toutes les régions, avant de commencer à régresser après 18 mois. Le code couleur indique la magnitude du développement des agrégats, de blanc : pas d'inclusions à rouge : quantité massive d'inclusions (Rey et al., 2018).

6) Comparaison des données humaines et provenant des modèles animaux

Parmi les éléments qui permettraient de réconcilier ces observations, l'un est un facteur de taille : un cerveau de souris, bien que complexe et relativement riche en neurones, est d'une taille assez faible en comparaison au cerveau humain : 0,5 versus 1000 centimètres cubes. On peut donc faire

l'hypothèse que de par la plus grande abondance numérique de neurones vulnérables chez l'humain, l'agrégation puisse s'y propager plus longtemps, le substrat étant plus abondant. Le facteur temps joue également ici, car on tente de récapituler en quelques mois dans les modèles murins une progression se faisant sur plusieurs dizaines d'années chez les patients. Une autre hypothèse est que les patients humains présentent des facteurs génétiques, non identifiés dans les cas sporadiques, qui aggravent la propagation de l'agrégation en comparaison aux modèles murins WT utilisés dans ces études. Quel pourraient être ces facteurs ? Le niveau d'expression de l'aSyn est élevé dans les animaux transgéniques, et ces animaux développent très rapidement des inclusions dans un nombre élevé de régions (Luk et al., 2012b). Cependant, la forme de l'aSyn qui y est exprimée est généralement une forme mutante, le plus souvent la A53T humaine. On ne peut cependant exclure que tout ou partie des patients présentent des mutations dans les voies de signalisation modulant le niveau d'expression de l'aSyn, voire modulant les MPTs pro-agrégation de celle-ci. En effet, le niveau d'expression de l'aSyn est un modulateur crucial du développement de la pathologie chez l'humain (Ibáñez et al., 2004; Singleton et al., 2003), et des mutations hors de la séquence codante de l'aSyn, par exemple dans des ARNs longs non codants, peuvent accélérer le développement de l'agrégation en augmentant l'expression de l'aSyn (Lu et al., 2018). Qui plus est, des mutations réduisant la dégradation de l'aSyn causent des formes familiales de la MP. Mesurer le niveau d'expression est malheureusement difficile chez les patients : l'aSyn s'accumulant dans les inclusions, on ne peut mesurer le niveau d'expression de la protéine en la dosant directement. Cependant, on pourrait doser la quantité d'ARNm SNCA pour déterminer si le taux de production de ceux-ci est modifié par rapport aux contrôles. Quoi qu'il en soit, même si les injections de PFF dans des animaux WT apportent des éléments en faveur d'une propagation trans-synaptique de l'agrégation, elles ne permettent pas d'expliquer comment celle-ci atteint une telle ampleur chez les patients.

7) *Transport axonal*

L'aSyn multimérique est transportée de façon rétrograde et antérograde dans les axones *in vivo* et *in vitro*, en grande partie suivant une cinétique lente de type b (Brahic et al., 2016; Danzer et al., 2011; Freundt et al., 2012; Li et al., 2004; Rey et al., 2013). Ce type de transport est caractérisé par des pauses fréquentes et une vitesse caractéristique de 0,2-10 mm / jour (Tang et al., 2012), est

dépendant des microtubules, mais pas de l'actine (Roy et al., 2008), et semble ralentir avec l'âge (Li et al., 2004). Il permet le transport non vésiculaire de protéines organisées en assemblage commun. L'aSyn monomérique est par exemple transportée en association avec la synapsine 2 et GAPDH (Roy et al., 2007; Tang et al., 2012). Une des hypothèses pour expliquer la variété (environ 200) des protéines transportées selon ces modalités est que leur fixation aux moteurs moléculaires s'effectue *via* des fragments de cytosquelette, dont le transport suivant la modalité du composant lent type b du transport axonal est avéré (Black and Lasek, 1980; Squire, 2009). L'aSyn interagit en effet avec les microtubules (Zhou et al., 2010). Le transport axonal de ses formes multimériques pourrait donc reposer sur cette interaction, à condition que la partie de l'aSyn responsable de celle-ci ne soit pas enfouie au coeur des fibres amyloïdes. Alternativement, les espèces agrégées de l'aSyn pourraient être transporté par ce système *via* des sites d'interaction spécifiques à ces formes. Le transport axonal est compromis dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (De Vos et al., 2008), ce qui pourrait contribuer à la surconcentration locale de protéines associées à des pathologies neurodégénératives et à leur agrégation. Il pourrait également être provoqué par l'accumulation de ces protéines encore liées aux moteurs moléculaires.

8) Direction de la propagation

Le sens de propagation de l'agrégation reste encore mal compris. En effet, à l'échelle intracellulaire l'agrégation de l'aSyn semble se faire de façon rétrograde : les agrégats se développent dans l'axone de neurones présentant une très forte arborescence axonale, puis envahissent la cellule en suivant un patron rétrograde, jusqu'au corps cellulaire (Uchihara, 2017) (Fig 16). Cette propagation est probablement liée à la répartition intracellulaire de l'aSyn soluble, qui est majoritairement présynaptique. Cependant, à l'échelle intercellulaire, la direction de propagation de l'agrégation reste incertaine. En effet, les stades I à III du staging de Braak impliquent successivement dMNx, locus coruleus puis SNpc, avant que les LBs atteignent d'autres régions du SNC. Or le dMNx envoie ses projections axonales vers la périphérie, tandis que le locus coruleus et la SNpc innervent le SNC. Ainsi, si l'agrégation se propage de façon rétrograde depuis la périphérie vers le DMNx, elle se propage ensuite de façon antérograde du DMNx vers le locus coruleus, puis du locus coruleus à la SNpc. Si certains auteurs estiment que cet élément est en défaveur d'une propagation prion-like de l'aSyn *via* les connexions neuronales, un scénario permet de réconcilier ces deux

observations. En effet, la propagation des agrégats d'aSyn peut se faire de façon bidirectionnelle, et est extrêmement rapide (Brahic et al., 2016; Rey et al., 2013). La nucléation de l'aSyn endogène est beaucoup plus lente (Luk et al., 2009; Volpicelli-Daley et al., 2011). Il est donc totalement envisageable que la dissémination des agrégats seedants puisse se faire intracellulairement et intercellulairement de façon bidirectionnelle, puis que l'agrégation de l'aSyn endogène se fasse depuis le site de forte concentration physiologique, la présynapse, avant de progresser de façon rétrograde dans le corps cellulaire.

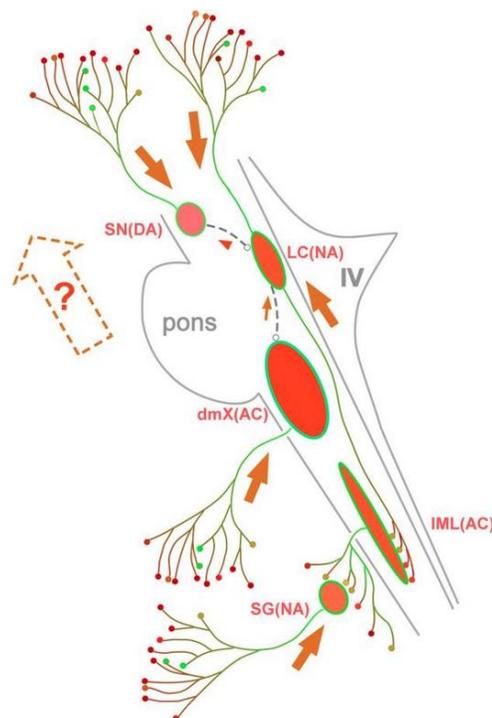


Figure 16 - Propagation de l'agrégation dans le tronc cérébral chez les patients humains

Le développement des inclusions d'aSyn dans les différents noyaux du tronc cérébral semble suivre une logique rétrograde au sein des neurones, et rétrograde puis antérograde à l'échelle des noyaux. SN:substantia nigra ; LC:locus coeruleus ; dmX:noyau moteur dorsal ; IML:noyau intermédiolatéral ; SG:ganglions sympathiques (Uchihara, 2017).

9) Tunneling nanotubes

Il a été proposé que le transfert intercellulaire d'agrégats d'aSyn puisse se faire *via* des jonctions directes du cytoplasme de deux cellules par des extensions filopodiales dénommées *tunneling nanotubes* (TNTs). Leur biologie reste mystérieuse, de par l'absence de techniques permettant d'interférer spécifiquement avec leur formation (Yamashita et al., 2018). Des lignées cellulaires

sont capables d'échanger des organelles *via* les TNTs (Rustom et al., 2004), ce qui pourrait constituer un mécanisme de sauvetage des cellules endommagées *via* l'apport de mitochondries intactes, par exemple (Wang and Gerdes, 2015). Les TNTs sont plus souvent générés par les cellules endommagées, suggérant que leur formation se fait en réponse au stress afin de permettre l'apport d'organelles intactes. Ils pourraient également avoir un rôle dans la lyse de cellules par le système immunitaire (Chauveau et al., 2010). Les TNTs favorisent le transfert intercellulaire d'agents infectieux, tels que le virus de l'immunodéficience humaine (Kumar et al., 2017; Xu et al., 2009) ou *Escherichia coli* (Jackson et al., 2016). Ils peuvent également propager divers agrégats impliqués dans des pathologies neurodégénératives dans des lignées cellulaires (Saïda Abounit et al., 2016; Costanzo et al., 2013; Ding et al., 2015; Gousset et al., 2009) (Gousset nat cell biol 2009, Costanzo J cell sci 2013, Ding X Oncotarget 2015, Abounit Prion 2016). La formation de TNTs est augmentée par l'expression ou l'internalisation de protéines pathologiques dans ces études. Le transfert de PFFs d'aSyn pourrait également se faire par les mêmes modalités dans des lignées cellulaires, ou depuis des neurones en culture primaires vers des lignées cellulaires (Saïda Abounit et al., 2016). Cependant, l'absence de protocole permettant d'interférer avec la formation de TNTs, et l'absence de marqueurs spécifiques de TNTs ne permettent pas d'affirmer que le transfert interneuronal d'agrégats est dépendant de la formation de ces structures. La facilitation du transfert des PFFs d'aSyn par le contact direct entre les neurones supporte une telle hypothèse, mais d'autres mécanismes de transfert pourraient expliquer cette observation. L'observation exclusive de TNTs dans des lignées cellulaires immortalisées remet également en question la pertinence de ce mécanisme dans des cultures neuronales primaires, ou *in vivo*. Le développement de nouvelles méthodes de détection de ces extensions cellulaires, comme la cryo-EM, pourrait potentiellement permettre d'élucider l'importance de ce mécanisme de transfert.

10) Sécrétion - Exocytose

Alternativement le transfert d'agrégats d'aSyn entre les cellules pourrait impliquer leur sécrétion dans le milieu extracellulaire suivie de leur internalisation par une autre cellule. Comme évoqué précédemment, l'aSyn soluble est sécrétée de façon physiologique dans de nombreux modèles.

Plusieurs éléments indiquent que les formes pathologiques de l'aSyn sont elles aussi sécrétées. En effet, la fraction de l'aSyn sécrétée est enrichie en formes pathologiques, et cette sécrétion est augmentée par le stress cellulaire (Fontaine et al., 2016; Jang et al., 2010; Lee et al., 2011, 2016). Des formes agrégées internalisées à partir du milieu extracellulaire sont ensuite sécrétées par les axones ou les somas/dendrites de neurones en culture (Brahic et al., 2016; Danzer et al., 2011), un processus modulé par les protéines Rab11a et Hsp90 (Liu et al., 2009). La chaperonne Hsp70 module quant à elle l'oligomérisation de l'aSyn sécrétée par des lignées cellulaires (Danzer et al., 2011). La fraction de l'aSyn sécrétée dans le milieu extracellulaire pourrait avoir une action toxique, potentiellement de par son enrichissement en formes agrégées (Danzer et al., 2011; Desplats et al., 2009; Emmanouilidou et al., 2010; Jang et al., 2010, p. 201). Les formes solubles ou agrégées de l'aSyn sécrétées dans le milieu extracellulaire sont la cible de protéases telles que la kalikrein-6, ce qui suggère que l'expression relative de ces diverses protéases puisse limiter la propagation prion-like de l'aSyn dans certaines régions cérébrales (Kasai et al., 2008; Tatebe et al., 2010). En effet, la surexpression de cette enzyme réduit l'accumulation intracellulaire de l'aSyn dans un modèle murin de la MSA, supportant un rôle de la transmission de l'aSyn dans le milieu extracellulaire dans le développement de cette pathologie (Spencer et al., 2015).

11) Sécrétion - Exosomes

Une partie de l'aSyn est sécrétée dans le milieu extracellulaire en association avec des exosomes, et ses formes agrégées pourraient être transférées de cellule à cellule *via* ce mécanisme, qui les protégerait de la dégradation dans le milieu extracellulaire. En effet, l'injection d'exosomes de patients parkinsoniens contenant de l'aSyn oligomérique et monomérique est suivie de son transfert aux neurones et microglies (Xia et al., 2019). La sécrétion d'aSyn monomérique ou oligomérique associée à des exosomes a été identifiée dans des cultures primaires neuronales murines et dans des cerveaux de souris, un processus augmenté par des mutations dans *GBA* (Papadopoulos et al., 2018). L'injection intracérébrale chez des souris WT d'exosomes purifiés du cerveau de patients atteints de DLB provoque l'agrégation de l'aSyn (Ngolab et al., 2017), et des exosomes purifiés à partir du LCR de patients MP et DLB provoquent l'agrégation de l'aSyn dans des lignées cellulaires rapportrices (Stuendl et al., 2016).

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires sécrétées *via* la fusion d'un corps multivésiculaire (*multivesicular body*, MVB) avec la membrane cellulaire, ou *via* le bourgeonnement direct de radeaux lipidiques riches en cholestérol (Booth et al., 2006). Les MVBs sont des compartiments intracellulaires contenant des vésicules intraluminales (*intraluminal vesicles*, ILVs), d'une taille (30-90nm), densité (1.1-1.2 g/ml) et composition lipidique caractéristiques. Les MVB fusionnent soit avec des lysosomes afin de dégrader les protéines à la surface des ILVs, soit avec la membrane cytoplasmique pour éjecter les ILVs dans le milieu extracellulaire (van Niel et al., 2006). Les ILVs une fois sécrétées sont appelées exosomes, et possèdent à leur surface des protéines permettant leur adhésion à des types cellulaires spécifiques, potentiellement suivie par leur internalisation ou leur fusion avec la membrane plasmique. Ainsi, les molécules associées aux exosomes peuvent être transmises de cellule à cellule. Les exosomes peuvent contenir des ARNs messagers, des micro ARNs, des protéines et sont notamment impliqués dans la communication intercellulaire lors du développement (McGough and Vincent, 2016; Valadi et al., 2007).

Les exosomes pourraient être transmis trans-synaptiquement, en faisant des candidats attractifs pour expliquer un potentiel transport trans-synaptique de protéines pathologiques. Notamment, des études sur la jonction neuromusculaire (JNM) de la larve de drosophile ont permis de mettre en évidence un transfert trans-synaptique de facteurs de transcription associés à des exosomes, dépendante de leur association à la protéine Evi (Koles et al., 2012; Korkut et al., 2009). Cependant, la JNM est une synapse très particulière contenant un système intriqué de cavités postsynaptiques. Qui plus est, ces expériences ont été réalisées dans la larve de la drosophile, à un stade de développement peu avancé pendant lequel de nombreux facteurs de transcriptions circulent de cellule à cellule (Neumann and Cohen, 1997). On peut donc s'interroger sur l'applicabilité de ce mécanisme à d'autres synapses et à un stade développement tardif. Toutefois, Evi possède un homologue chez l'humain, dont la fonction est conservée, et sa déplétion dans des cellules humaines perturbe la sécrétion de facteurs de transcription (Bänziger et al., 2006; Bartscherer et al., 2006). On peut donc supposer qu'un mécanisme similaire ait été conservé chez l'humain, et puisse jouer un rôle dans la transmission trans-synaptique de facteurs de transcription. La protéine Arc chez les tétrapodes et son homologue chez la drosophile dArc1 sont également transmises de cellule à cellule *via* la sécrétion d'exosomes. dArc1 est transférée trans-synaptiquement à la JNM de la larve

de la drosophile suivant un mécanisme similaire à celui d'Evi. De façon extrêmement surprenante, Arc et dArc1 s'assemblent en structures proches des capsides virales, suggérant une origine virale de certains mécanismes de transfert intercellulaire de protéines *via* des exosomes (Ashley et al., 2018; Korkut et al., 2009). Ainsi, certains facteurs de transcriptions peuvent se transmettre de neurones à neurones en association avec des exosomes, trans-synaptiquement à la JNM de la larve de la drosophile. Ces mécanismes originaux de transfert de protéines pourraient potentiellement être un vecteur pour des protéines pathologiques telles que l'aSyn.

La transmission interneuronale, potentiellement trans-synaptique d'exosomes contenant des protéines pathologiques n'a pas encore été démontrée chez les mammifères, mais une série d'éléments en supporte la possibilité. Les membranes postsynaptiques autour de la fente synaptique contiennent des radeaux lipidiques compatibles avec la sécrétion directe d'exosomes, et des MVBs ont été détectés dans cette région (Blanpied et al., 2002; Cooney et al., 2002; Sheng and Hoogenraad, 2007). Des exosomes sont produits par des cultures neuronales primaires murines d'hippocampe ou de cortex (Chivet et al., 2014; Lachenal et al., 2011; Wang et al., 2017). Leur sécrétion est modulée par l'activité glutamatergique des neurones, et leur contenu provient pour partie des voies d'internalisation endosomales, ce qui supporte que les formes agégées d'aSyn dirigées vers ces compartiments puissent ensuite être sécrétées en association avec des exosomes. Qui plus est, les exosomes générés par des neurones sont préférentiellement internalisés par d'autres neurones, suggérant que cette voie de communication permet un transfert inter-neuronal spécifique de matériel cellulaire (Chivet et al., 2014). La protéine Rab11, dont l'homologue chez la drosophile régule la transmission trans-synaptique exosomale de facteurs de transcription, régule également la sécrétion de l'aSyn dans des lignées cellulaires, donnant un lien direct entre les mécanismes de transfert trans-synaptique de protéines chez la drosophile et le transfert intercellulaire de l'aSyn (Chutna et al., 2014).

12) Interaction de l'aSyn avec des partenaires membranaires

A la suite de leur sécrétion directe dans l'espace extracellulaire, les agrégats d'aSyn doivent se fixer à un partenaire sur la membrane externe des neurones pour être internalisés et perpétuer la propagation de l'agrégation. Des fibres d'aSyn recombinantes se fixent sur la membrane

extracellulaire, où elles diffusent latéralement puis se fixent à la sous unité alpha3 de la pompe ATPase sodium/potassium (Shrivastava et al., 2015). Les assemblages d'aSyn se fixent également à la protéine LAG3, qui favorise leur internalisation (Mao et al., 2016). La même étude avait identifié plusieurs autres partenaires protéiques extracellulaires des agrégats d'aSyn, dont la neurexin 1 et APLP1. Ces deux dernières sont des protéines synaptiques (Schilling et al., 2017; Südhof, 2017), et pourraient donc être nécessaires à la dissémination trans-synaptique d'agrégats d'aSyn. Les assemblages d'aSyn et d'autres protéines pathologiques se lient aux heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) (Birol et al., 2019; Holmes et al., 2013; Horonchik et al., 2005; Schonberger et al., 2003; Shrivastava et al., 2015), dont la dégradation spécifique réduit l'internalisation de tau et de l'aSyn. De façon intrigante, des agrégats de conformations distinctes n'ont pas la même dépendance aux HSPGs (Ihse et al., 2017), et les agrégats de tau et d'aSyn ne sont pas internalisés par les mêmes HSPGs (Stopschinski et al., 2018) ce qui suggère des mécanismes d'internalisation distincts pour des polymorphes distincts. Les HSPGs jouent un rôle important dans la maturation et la fonction synaptiques, et des répertoires uniques d'HSPGs sont présents à la surface des neurones (Condomitti and de Wit, 2018). L'aSyn interagit donc avec plusieurs molécules présentes à la membrane extracellulaire des neurones, dont certaines sont également présentes à la synapse. Ces éléments supportent la possibilité d'une propagation trans-synaptique des agrégats d'aSyn, et suggère que l'enrichissement spécifique de ces partenaires dans certaines synapses influence la propagation de l'agrégation de l'aSyn.

13) Internalisation de l'aSyn

L'injection simultanée d'agrégats d'aSyn et d'inhibiteurs d'endocytose réduit l'internalisation neuronale de celle-ci *in vivo* (Hansen et al., 2011). L'endocytose est également impliquée dans le transfert d'aSyn à des greffons de neurones dopaminergiques réalisés chez des rats surexprimant l'aSyn (Angot et al., 2012). Qui plus est, l'internalisation de l'aSyn est inhibée par la réduction pharmacologique ou génétique de l'activité des dynamine GTPases, qui ont un rôle dans l'endocytose (Konno et al., 2012; Reyes et al., 2015), ou par la mutation dominante négative K44A de la dynamine 1 (Desplats et al., 2009; Lee et al., 2010). L'internalisation de l'aSyn pourrait également se faire par d'autres voies. L'aSyn peut notamment être internalisée par pénétration directe de la membrane plasmique, et donc provoquer l'apparition d'agrégats non associés aux

endosomes, en sus de ceux associés aux endosomes. Il semble que cette voie d'internalisation directe soit plus efficace pour le seeding de l'aSyn endogène, et que des assemblages distincts d'aSyn soient préférentiellement internalisés par la voie endolysosomale ou par pénétration directe (Jiang et al., 2017). L'interaction avec les HSPGs pourrait être suivie de l'internalisation par macropinocytose des assemblages d'aSyn, les assemblages de tau et d'autres protéines pathologiques étant internalisés de cette manière (Holmes et al., 2013; Münch et al., 2011). La macropinocytose pourrait donc être un mécanisme d'endocytose non conventionnelle de l'aSyn (Lee et al., 2005). L'internalisation d'exosomes associés à des oligomères d'aSyn se fait par des mécanismes inconnus, indépendamment de l'endocytose clathrine- ou caveoline-dépendante, de la macropinocytose et des HSPGs (Delenclos et al., 2017). Les assemblages extracellulaires d'aSyn sont dirigés vers les compartiments endolysosomaux, et colocalisent avec des marqueurs d'endolysosomes à divers stades de maturité (Konno et al., 2012; Lee et al., 2005, 2008a). Les PFF sont majoritairement détruites dans les lysosomes (Mak et al., 2010), tandis qu'une partie est capable de provoquer la rupture des membranes endolysosomales, accédant au cytosol (Flavin et al., 2017; Freeman et al., 2013; Jiang et al., 2017).

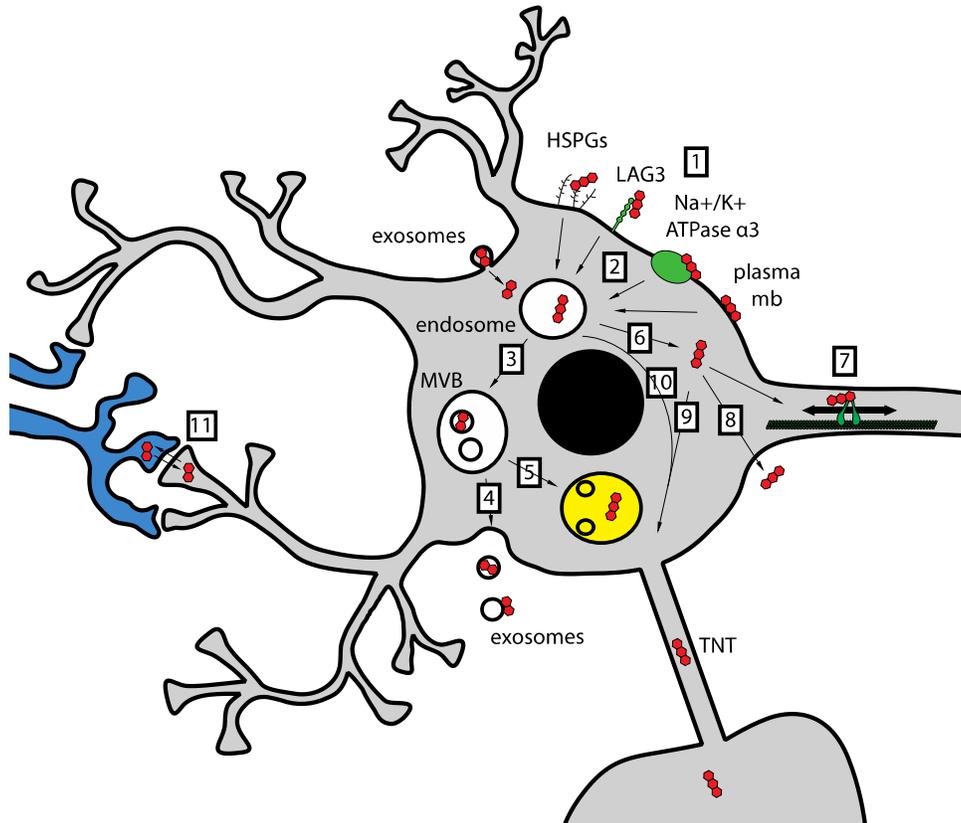


Figure 17 - Etapes dans le transfert intercellulaire d'agrégats d'aSyn

Figure non exhaustive. (1) Les agrégats d'aSyn extracellulaires (en rouge) peuvent interagir avec plusieurs partenaires à la surface des neurones, dont les heparan sulfate proteglycans (HSPGs), LAG3, la sous-unité alpha 3 de la pompe Na^+/K^+ ATPase, et la membrane plasmique. (2) ils sont ensuite internalisés par des mécanismes d'endocytose encore mal compris, potentiellement par macropinocytose, et sont dirigé vers le compartiment endolysosomal. (3) Les endosomes se transforment progressivement en corps multivésiculaires (MVBs), qui peuvent soit (4) éjecter leur contenu dans le milieu extracellulaire, libérant des exosomes potentiellement associés à des formes agrégées de l'aSyn, ou (5) mûrir en autophagolysosome par fusion avec des lysosomes.

(6) Les agrégats d'aSyn peuvent également gagner accès au cytosol par rupture de la paroi endolysosomale, et être ensuite (7) transportés de façon bidirectionnelle en suivant un transport axonal lent de type b associé aux microtubules. (8) Les agrégats endogènes pourraient également traverser directement la membrane plasmique par des mécanismes inconnus, ou (9) être transportés *via* des tunneling nanotubes (TNTs) vers d'autres cellules, potentiellement (10) en association avec des vésicules intracellulaires. (11) Le rôle de la synapse dans la propagation interneuronale reste mystérieux.

14) Internalisation de l'aSyn dans les cellules gliales

L'aSyn est également internalisée par les astrocytes (Kovacs et al., 2014; Loria et al., 2017) et les microglies (Liu et al., 2007). Des lignées cellulaires proches des oligodendrocytes, des astrocytes

et des microglies n'ont pas les mêmes mécanismes d'internalisation de l'aSyn, ces deux dernières ne nécessitant pas de HSPGs (Ihse et al., 2017). L'effet de l'internalisation d'agrégats par les cellules gliales est contradictoire. En effet, les astrocytes (Loria et al., 2017) et les microglies (Bae et al., 2012; Lee et al., 2008b) internalisent très efficacement certains agrégats, et sont capables de les dégrader plus efficacement que les neurones. Qui plus est, les microglies internalisent plus efficacement des exosomes de patients contenant de l'aSyn que les astrocytes et les neurones (Xia et al., 2019). L'internalisation d'aSyn par les microglies pourrait augmenter la mort neuronale *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (Zhang et al., 2005), et les espèces fibrillaires pourraient faire basculer les microglies vers un phénotype actif (Hoffmann et al., 2016). Qui plus est, l'internalisation d'aSyn semble provoquer des dommages chez les astrocytes (Lindström et al., 2017).

15) Toxicité

Le lien entre agrégation et toxicité est encore mal compris, et pourrait s'exercer selon deux modalités principales, un gain de fonction toxique de certains agrégats ou une perte de fonction de l'aSyn soluble et d'autres protéines, leur capture dans les agrégats diminuant leur concentration en deçà de celle à laquelle elles peuvent exercer leur fonction.

Plusieurs études ont rapporté que l'introduction de PFF dans des cultures neuronales induisait des dysfonctions neuronales, entre autres une perturbation de la dynamique mitochondriale (Iasmézas, Gribaudo, Grassi *J Neurobiol Dis* 2018), de l'activité synaptique (Shrivastava et al., 2015; Volpicelli-Daley et al., 2011) et de l'intégrité synaptique (Wu et al., 2019). In vivo, l'injection de PFF provoque la dégénérescence de certaines populations neuronales, dont les neurones dopaminergiques de la SNpc, des dysfonctions motrices, voire la mort dans certains modèles mutants (Luk et al., 2012a, 2012b; Mougenot et al., 2012; Peelaerts et al., 2015). L'effet toxique des assemblages multimériques d'aSyn pourrait être majoritairement dû aux formes oligomériques (voir paragraphe "oligomères"). La sensibilité accrue des modèles transgéniques de type TgM83 suggère que l'agrégation de l'aSyn pourrait accroître la toxicité induite par l'injection de PFFs.

La perte de fonction de l'aSyn pourrait également induire une toxicité. Cependant, un KO de l'aSyn ne provoque pas de dysfonctions mitochondriales (Pathak et al., 2017), ni de changements

morphologiques cérébraux (Abeliovich et al., 2000; Anwar et al., 2011; Burré et al., 2010; Chandra et al., 2004). Elle induit tout de même des troubles modérés de l'activité synaptique et du comportement (Abeliovich et al., 2000; Cabin et al., 2002; Kokhan et al., 2012). L'aSyn joue un rôle dans la maintenance de la fonction synaptique, potentiellement *via* son rôle de chaperonne (Chandra et al., 2005), mais cette fonction semble en partie assurée de façon redondante par la beta-synucléine et la gamma-synucléine (Greten-Harrison et al., 2010). Les effets d'un KO de l'aSyn se révèlent donc tardivement dans des modèles murins, et indiquent une fonction de stabilisation de la synapse mature pour l'aSyn. Chez l'humain, le développement de la MP se fait sur plusieurs dizaines d'années, dépassant très largement la vie de plusieurs souris, et les synapses sont maintenues pendant de bien plus longues périodes. Ainsi, on ne peut exclure qu'une perte de fonction de l'aSyn puisse entraîner des dysfonctions synaptiques sur le long terme chez l'humain, ou que le rôle de l'aSyn dans la physiologie cérébrale humaine soit plus important que chez la souris. La détermination de l'impact d'une délétion naturelle du locus de *SNCA* chez l'humain permettrait d'éclaircir ce dernier point. La toxicité ne semble pas favoriser la propagation de l'agrégation *in vitro* ou *in vivo* (Brahic et al., 2016; Ulusoy et al., 2015).

16) Conclusion

En conclusion, tous les mécanismes nécessaires à une propagation prion-like de l'aSyn dans les réseaux neuronaux ont été vérifiés expérimentalement, *in vitro* et *in vivo*. L'efficacité relative de chacun de ces mécanismes au niveau local pourrait influencer le patron de propagation de l'agrégation. Les données disponibles dans les modèles animaux et l'examen neuropathologique post-mortem du cerveau de patients atteints de synucléinopathies indiquent en effet que la propagation n'est pas uniquement dépendante de la densité des connexions synaptiques, mais également de la vulnérabilité intrinsèque de populations neuronales. Il n'est cependant toujours pas clair quelles étapes de la propagation intercellulaire de l'agrégation influencent le plus profondément ce patron de propagation.

VI) Synapses et propagation de l'agrégation de l'aSyn

L'hypothèse d'un passage trans-synaptique est proposée de façon intuitive. Cependant, aucune preuve expérimentale directe n'a encore permis de prouver que l'aSyn se propage trans-synaptiquement, et le patron de propagation de l'agrégation chez l'humain ne dépend pas uniquement de la connectivité synaptique entre les régions (Surmeier et al., 2017) (Fig 18). La plupart des mécanismes évoqués précédemment sont compatibles avec une propagation *via* les zones extrasynaptiques ou *via* la fente synaptique. Certains, comme les TNTs, sont encore très mal connus mais leur physiologie rend difficile d'envisager leur présence dans une structure synaptique. Nous allons donc revoir les éléments en rapport avec l'hypothèse d'une propagation trans-synaptique de l'agrégation de l'aSyn.

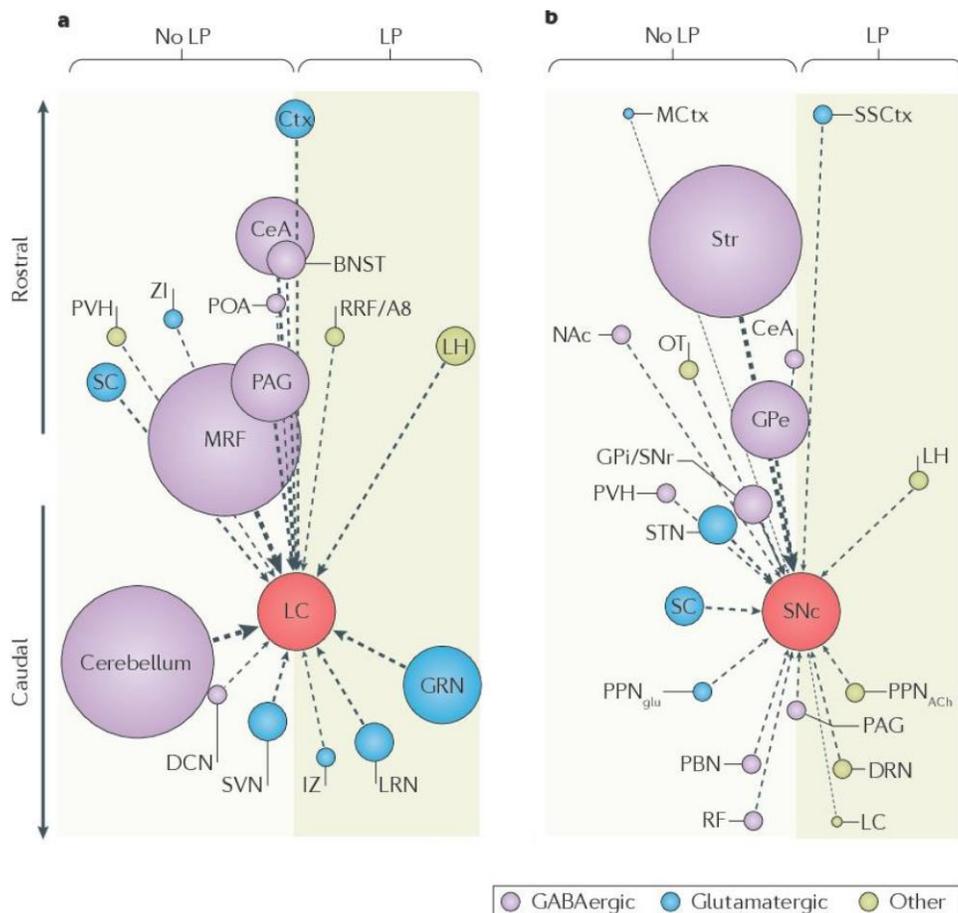


Figure 18 - Absence de corrélation entre poids synaptique et propagation de l'agrégation
 (a) Connectome du locus coruleus (LC) et quantité de pathologie à corps de Lewy (*Lewy*)

pathology, LP). Les poids synaptiques sont indiqués par la taille des cercles, et la quantité de corps de Lewy par la position sur l'axe des abscisses. Le type de neurone est indiqué par la couleur des cercles. (b) Idem pour le connectome de la substantia nigra pars compact (SNc). Aucune corrélation entre les poids synaptiques et la quantité de LP n'est observable, indiquant que des facteurs de vulnérabilité intrinsèque des populations neuronales modifient la progression de la pathologie depuis les régions touchées précocement (Surmeier et al., 2017).

1) *Propagation trans-synaptique de virus*

Une partie des virus neurotropes se propageraient préférentiellement *via* les contacts synaptiques, et leur biologie est à l'origine de l'hypothèse d'une propagation de l'agrégation de l'aSyn (H. Braak et al., 2003; Hawkes et al., 2007). Le virus de la rage, par exemple, se propage depuis son site d'inoculation jusqu'aux régions interconnectées d'une façon strictement dépendante du poids synaptique (Ugolini, 1995). Le récepteur au virus de la rage est exprimé de façon ubiquitaire dans les neurones du SNC, ce qui pourrait expliquer sa plus grande dépendance aux connections synaptiques par rapport à l'aSyn (Ugolini, 2008). Les rétrovirus neurotropes se propagent de façon rétrograde en utilisant la machinerie de synthèse d'exosomes (Sampey et al., 2014; Van Pottelsberghe et al., 1979). Certains herpesvirus neurotropes se propagent de façon antérograde et sont eux aussi dépendants de la sécrétion d'exosomes (Mettenleiter, 2003) et des structures synaptiques, le HSV-1 provoquant même la formation de nouvelles synapses pour se propager plus efficacement (Acuña-Hinrichsen et al., 2019). Ces virus envahissent le SNC depuis la périphérie (Castle et al., 2014). La similarité entre le patron d'envahissement du SNC par le virus HSV-1 depuis le nerf vagal et celui du développement de l'agrégation de l'aSyn dans le staging de Braak pourrait suggérer que leurs mécanismes de propagation se recoupent en partie, bien que leur cinétique diffère significativement (Hawkes et al., 2007). Ainsi, les mécanismes hypothétiques de propagation de l'aSyn dans les réseaux de neurones ressemblent à ceux de certains virus neurotropes, et la recherche sur la propagation interneuronale de l'agrégation de l'aSyn gagnerait sans doute à s'inspirer de la biologie de ces derniers. Si le parallèle entre ces deux pathogènes se vérifiait, l'hypothèse d'une propagation trans-synaptique de l'aSyn s'en trouverait renforcée.

2) *Transport trans-synaptique de tau*

Calafate et collègues ont rapporté en 2015 que l'agrégation de tau pouvait se transmettre depuis des cellules immortalisées jusqu'à des neurones en contact axonal avec celles-ci (Calafate et al., 2015).

Ils montrent également que l'agrégation peut se propager à travers trois populations neuronales connectées axonalement *via* des microcanaux. Les auteurs démontrent que l'expression de neuroligin1 et LRRTM2 dans les lignées cellulaires augmente la quantité de synapses entre celles-ci et les axones des neurones primaires, augmentant également la quantité d'agrégats dans les neurones. L'extinction de la Neuroligin1 par interférence ARN dans le système purement neuronal réduit la propagation de l'agrégation. Ces résultats indiquent que la présence de synapses augmente la propagation de l'agrégation de tau, et suggèrent que l'aSyn, partageant déjà un certains nombres de mécanismes de propagation avec tau, pourrait elle aussi se propager *via* celles-ci (Vasili et al., 2019). Cependant, l'agrégation de tau se propage même en l'absence de synapses dans ce système, ce qui semble indiquer l'existence d'autres mécanismes de transfert.

3) Localisation subcellulaire de l'aSyn et activité synaptique

La plus grande partie de l'aSyn est présente à la présynapse. Or la cinétique d'élongation des amyloïdes est directement dépendante de la concentration. Une propagation rétrograde est donc particulièrement favorable énergétiquement, l'internalisation d'un agrégat à la présynapse pouvant déboucher très facilement sur le recrutement rapide de molécules d'aSyn dans des agrégats pathologiques. Qui plus est, l'activité synaptique peut réguler plusieurs aspects de la biologie de l'aSyn, tels que son accumulation présynaptique (Fortin et al., 2005). Des mutations familiales de l'aSyn ont des effets distincts sur la diffusion de la protéine de la synapse, potentiellement indicatif de leurs effets distincts sur l'interaction vésiculaire de l'aSyn (Burré et al., 2015; Fortin et al., 2005; Jo et al., 2002)). Ainsi, la dissociation de l'aSyn des vésicules synaptiques pourrait la rendre plus vulnérable à son recrutement dans des agrégats amyloïdes. L'activité électrique pourrait également avoir un impact sur la phosphorylation de l'aSyn, *via* l'activation de de PLK2, et également sur sa dégradation (Oueslati et al., 2013; Seeburg and Sheng, 2008). Ainsi, l'aSyn est particulièrement concentrée à la synapse, où elle change régulièrement de conformation, et plusieurs aspects de sa biologie sont contrôlés par l'activité neuronale. On pourrait donc supposer que l'aSyn synaptique soit dans des conditions la rendant particulièrement favorable à son recrutement dans des agrégats.

4) Spinules synaptiques

Certaines synapses contiennent des structures appelées spinules, qui correspondent à une invagination de la membrane postsynaptique dans la présynapse et permettent d'augmenter la surface de contact entre membranes pré et postsynaptiques. Ces structures ont notamment été décrites dans l'hippocampe de rats adultes (Spacek and Harris, 2004), mais également dans le cortex et le cervelet (Petralia et al., 2018). Elles contiennent des puits riches en clathrine à leur extrémité, ce qui suggère un transfert de matériel intercellulaire dans cette région. On peut faire l'hypothèse que les spinules jouent un rôle dans le transfert des protéines prion-like. Cependant, les composés transportés *via* ce mécanisme n'ont pas encore été répertoriés. Il s'agirait de molécules de petite taille telles que les endocannabinoïdes, plutôt que d'assemblages multimériques de protéines.

5) Un hotspot d'exo/endocytose à la synapse

Les membranes pré et postsynaptiques sont extrêmement dynamiques. A la postsynapse, les protéines exprimées à la fente synaptique ou dans la région extrasynaptique sont régulièrement endocytées pour être recyclées ou voir leurs sites de liaison aux ligands régénérés, tandis que de nouvelles protéines sont transférées à la surface par fusion de vésicules intracellulaires avec la membrane (Gross and von Gersdorff, 2016). L'aSyn peut se lier à plusieurs protéines extracellulaires, dont certaines sont synaptiques : l'ATPase Na^+/K^+ , APLP1, neurexine 1 ou LAG3 (Mao et al., 2016; Shrivastava et al., 2015). L'aSyn sécrétée directement dans le milieu extracellulaire pourrait donc se lier à de telles protéines puis être internalisée dans le compartiment endo-lysosomal lors de leur recyclage, avant de provoquer la rupture de la paroi endo-lysosomale (Flavin et al., 2017, p. 20; Freeman et al., 2013) accédant ainsi au cytosol. En sens inverse, il est possible que de l'aSyn oligomérique en voie d'être dégradée dans le compartiment endolysosomal soit mise en contact avec des récepteurs transmembranaires en recyclage, s'associe à ceux-ci puis soit présentée à la surface. Un changement de conditions environnementales (pH, concentrations de minéraux, enzymes extracellulaires) suite à cette externalisation pourrait alors provoquer la dissociation de l'aSyn d'avec son partenaire protéique et son relargage dans le milieu extracellulaire. La présynapse subit des remodelages permanents *via* la fusion de vésicules de neurotransmetteurs. Il est possible que l'aSyn puisse être internalisée par la cellule en s'associant à

la face interne des vésicules synaptiques après leur fusion. De nombreuses protéines transmembranaires sont exposées à la surface interne des vésicules synaptiques, et pourraient se lier à l'aSyn lors de l'exocytose de neurotransmetteurs (Takamori et al., 2006). Cependant, le diamètre du lumen d'une vésicule synaptique est de l'ordre de 30nm, et est encombré par de nombreuses protéines transmembranaires. Ce mécanisme ne serait donc compatible qu'avec des espèces oligomériques de petite taille.

6) Une jonction proche des membranes

La fente synaptique est un endroit où les membranes plasmiques sont maintenues à une distance extrêmement faible : 20nm. Certains agrégats de grandes tailles peuvent traverser la membrane plasmique de lignées cellulaires depuis le milieu extracellulaire, et provoquer l'agrégation de l'aSyn intracellulaire par ce mécanisme (Jiang et al., 2017). Il est donc possible que l'accumulation synaptique d'agrégats d'aSyn mène à la rupture des membranes pré et postsynaptique par ceux-ci, qui pourraient alors provoquer l'agrégation de l'aSyn dans la cellule réceptrice.

7) Conclusion

Une propagation trans-synaptique de l'agrégation de l'aSyn est théoriquement possible, et souvent assumée comme vraie dans la littérature. Cependant, celle-ci n'a jamais été prouvée et les résultats expérimentaux indiquent plutôt qu'*in vitro* tout au moins, un passage non-synaptique est possible (Brahic et al., 2016; Freundt et al., 2012). Qui plus est, l'absence de corrélation entre poids synaptiques et patron de propagation pourrait indiquer, en sus d'une différence de vulnérabilité intrinsèque des populations neuronales, que les connexions synaptiques ne sont peut-être pas le site de transfert (Surmeier et al., 2017), ou que les différents types de synapses n'ont pas la même capacité à propager l'agrégation. Il est difficile de tester l'importance de la propagation trans-synaptique *in vivo*, car la vulnérabilité spécifique de populations neuronales modifie la propagation. Une approche expérimentale attractive pour tester ces hypothèses est la reconstruction de réseaux de neurones *in vitro*. Cet ensemble de techniques permet en effet de contrôler la connectivité de différentes populations neuronales et d'y étudier la propagation d'une agrégation prion-like. Nous allons aborder dans la partie suivante les différentes méthodes disponibles et leurs limitations.

VII) Reconstruction de réseaux de neurones *in vitro*

Depuis la découverte en 1907 que des cellules de vertébrés, dont des neurones, pouvaient être cultivées en dehors d'un organisme, les techniques de culture de cellules neuronales se sont extrêmement perfectionnées. Certaines de ces techniques visent à implémenter *in vitro* la caractéristique fondamentale à la base de leur fonction physiologique : leur connectivité suivant des topologies spécifiques. En effet, les neurones sont interconnectés dans le système nerveux suivant une architecture bien précise mêlant des éléments des *small world networks* et des caractéristiques modulaires, entre autres (Bassett and Bullmore, 2017). Si la propagation prion-like de l'aSyn se fait suivant les connections neuroanatomiques, alors la topologie et la nature des connections synaptiques ainsi que la nature des populations interconnectées sont les éléments qui vont aboutir à la génération d'un pattern d'agrégation tel que celui décrit dans le staging de Braak. Les techniques permettant de reconstruire des réseaux de neurones de topologies variées avec des populations neuronales choisies permettent donc d'évaluer l'impact du patron de connectivité sur la propagation. Ces techniques sont encore en cours de maturation, les techniques de microfabrication pour la culture de neurones ayant connu des avancées majeures ces 15 dernières années.

1) Culture neuronale

Les neurones ont une architecture très particulière, la longueur des prolongements dendritiques et axonaux dépassant de plusieurs ordres de grandeur le diamètre du soma. L'axone et le compartiment somatodendritique se retrouvent souvent dans des environnements très différents, et parfois extrêmement éloignés. Ces caractéristiques rendent complexe l'étude des neurones *in vitro*, et nécessitent que l'environnement *in vitro* recrée au plus proche les conditions habituelles dans lesquelles le neurone exerce sa fonction. Le premier, Harrison cultiva des neurones en dehors du corps humain grâce à la technique de la goutte inversée (*hanging drop*) : un fragment de tissu, ici du tube neural d'embryons de grenouille, était placé dans une goutte de sérum ou de lymphe partiellement coagulée, attachée à une lamelle de verre placée goutte vers le bas dans un compartiment clos (Harrison et al., 1907). Cette technique, adaptée de méthodes utilisées en bactériologie, permit à Harrison de prouver que les neurones étaient des entités discrètes,

démontrant de façon spectaculaire l'utilité de la culture cellulaire. Cette technique fut rapidement étendue à de nombreux types cellulaires issus de mammifères (Carrel and Burrows, 1910). Les fluides corporels utilisés comme milieu de culture furent également rapidement remplacés par des milieux de culture artificiels, ce qui permit une amélioration certaine de la reproductibilité des expériences (Lewis & Lewis 1911). La communauté scientifique améliora considérablement dans les décennies qui suivirent les méthodes de culture, les adaptant à divers types cellulaires issus d'organismes variés. On peut noter parmi les grandes étapes les flasques de Carrel. Elles permirent de réaliser des cultures sur le plus long terme en permettant de changer le milieu, de maintenir les cultures dans des conditions stériles et de permettre l'observation de celles-ci au microscope *via* de fines feuilles de mica (Carrel, 1923). La culture dans des tubes à essai permit également la culture de cellules en suspension ou en agrégats sur de longues durées, grâce à l'agitation du liquide permettant de réduire les hétérogénéités du milieu de culture. Cette technique ne permet cependant pas l'accès optique aux tissus en culture. L'utilisation de tranches organotypiques permit d'étudier les neurones dans le cadre de leur architecture *in vivo* tout en permettant leur observation et leur traitement. Afin de pouvoir observer les tissus au cours du temps, de nombreux designs de chambres de culture compatibles avec des lamelles de microscopie ont été développés, permettant la perfusion permanente des tissus cultivés par du milieu frais. La durée des cultures fut ainsi augmentée, et l'observation dynamique des tissus grandement facilitée (Millet and Gillette, 2012). Les cultures de neurones sous forme dissociée et en adhésion à un substrat solide transparent sont les plus communes depuis ces développements historiques. Elles permettent en effet d'observer avec une grande précision la morphologie des cellules, et d'avoir un accès facile aux échantillons par imagerie. Les avancées majeures des dernières décennies ont permis de contrôler l'architecture des neurones en culture, avec une précision toujours plus élevée.

2) Des micro-cultures autaptiques aux cultures compartimentalisées de neurones

Parmi les premières cultures imposant une architecture aux neurones, on peut noter la co-culture, sur des zones adhésives circulaires de quelques centaines de microns de diamètres, de cardiomyocytes et de neurones uniques (Furshpan et al., 1976). Cette méthode reposait sur le dépôt de gouttes de collagène sur une surface hydrophobe, qui permet de créer des zones d'adhésion géométriquement circonscrites, suivi de l'ensemencement successif de cardiomyocytes et de

neurones. Il s'agit de la première reconstruction contrôlée de jonctions neuromusculaires *in vitro*. Cette approche démontra l'utilité du contrôle au niveau microscopique des propriétés du substrat, et le potentiel que de telles méthodes pouvaient avoir par rapport aux cultures dissociées classiques. La culture de certains neurones isolés permet la génération d'auto-synapses (autapses), et a permis de nombreuses avancées en neurosciences (Bekkers and Stevens, 1991; Fenske et al., 2019). Cependant, le cerveau est constitué de neurones interconnectés, et rarement autaptiques. Les axones et somas de neurones ont des propriétés distinctes, et les techniques permettant d'intervenir séparément sur ces deux compartiments subcellulaires ont assurément une grande utilité. La chambre de Campenot est le premier système à réaliser ce défi. Ce système consiste en un morceau de téflon dans lequel des rayures ont été gravées, recouvert d'une fine couche de graisse et déposé avec la face rayée vers le bas. Il permet ainsi la croissance des neurites de neurones en culture d'un côté de l'insert en téflon vers l'autre. L'isolation fluïdique des deux compartiments due à la graisse permet de traiter sélectivement l'un ou l'autre des deux compartiments, et permet à Campenot de mettre en évidence l'effet local d'un facteur de croissance neuronal sur la pousse des neurites de cultures de ganglion spinal. Taylor et collègues reproduisirent en 2003 le design de Campenot en utilisant un matériau très utilisé pour la fabrication de systèmes miniaturisés en microfluidique, le polydiméthylsiloxane (PDMS) (Taylor et al., 2003). L'isolation fluïdique dans ce système ne repose pas sur la présence de graisse, mais sur l'écoulement très lent des liquides dans des conduits de taille microscopique, la résistance fluïdique de ces derniers étant inversement proportionnelle à leur diamètre. Ce dernier développement a permis de démocratiser l'utilisation de ce type de systèmes, ouvrant la voie à la culture compartimentalisée de nombreux types de neurones.

3) Systèmes de culture microfluidiques

La microfluidique est l'ensemble des techniques permettant de contrôler finement l'écoulement de liquides dans des réseaux de tubulures de dimensions micrométriques. Dans des conduits de cette taille, les solutions aqueuses s'écoulent selon des modalités laminaïres et non turbulentes dues au faible nombre de Reynolds (Fig 18A). Cela signifie que deux solutions différentes, perfusées à une vitesse constante et similaire dans un canal par deux entrées parallèles ne se mélangent pas par turbulence, mais seulement *via* la diffusion des solutés (Weibel and Whitesides, 2006) (Fig 18B). Ainsi, des gradients de diverses molécules peuvent être générés aisément à l'échelle micrométrique.

Les technologies microfluidiques ont trouvé un grand nombre d'applications dans tous les domaines de la science expérimentale où l'on manipule des fluides (chimie, physique, biologie). Le principe des applications développées consiste à remplacer les contenants (tubes, boîtes de pétris, fioles...) par des réseaux de tubulures micrométriques. Dans le cas de la biologie cellulaire, la microfluidique a naturellement trouvé des applications dans les expériences visant à compartimentaliser des cellules, les traiter localement, ou les mettre en contact contrôlé avec d'autres cellules. La précision de ces techniques est telle qu'elles permettent de perfuser différents compartiments subcellulaires d'une cellule isolée sur le long terme. Qui plus est, la quantité de réactifs nécessaire est énormément réduite par rapport aux dispositifs de culture classiques. Les traitements auxquels sont exposées les cellules en culture peuvent être contrôlés avec une grande précision temporelle, en plus de la précision spatiale. La microfluidique ouvre également la possibilité de réaliser en parallèle de nombreuses expériences sur des cultures cellulaires. Cet aspect est particulièrement intéressant dans le cadre de la recherche pharmaceutique, où bien souvent de nombreux composés doivent être introduits dans des cultures cellulaires suivant une gamme de concentrations.

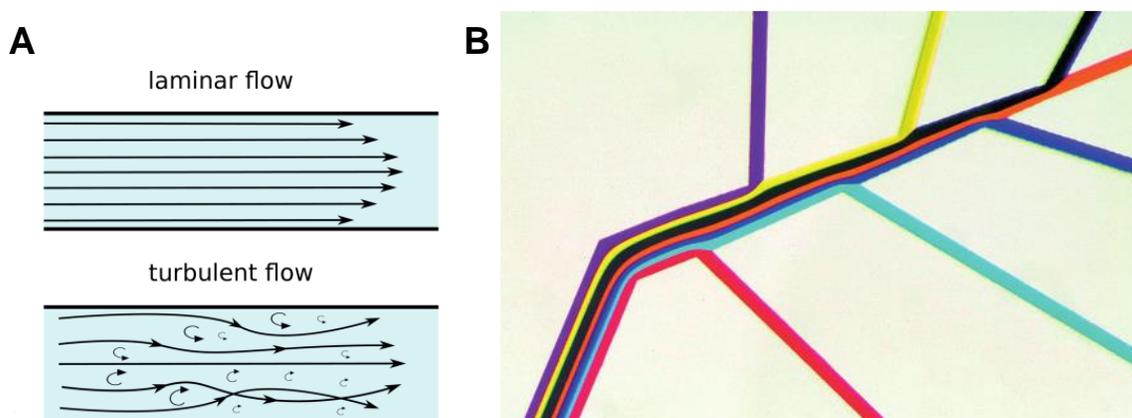


Figure 18 - Flot laminaire dans des tubulures micrométriques

(A) Illustration schématique de la différence entre un flot laminaire et un flot turbulent (Illustration obtenue depuis la page <https://www.cfdsupport.com/OpenFOAM-Training-by-CFD-Support/node334.html> le 26/07/2019) . (B) Perfusion en parallèle de différents colorants grâce à un dispositif microfluidique. Les colorants ne se mélangent pas, permettant la perfusion de domaines microscopiques (Illustration obtenue depuis la page https://openwetware.org/wiki/Laminar_Flow_-_Marco_Zaky_Elizabeth_Swanson_and_Jay_Mistri le 26/07/2019)

4) Fabrication des dispositifs microfluidiques

De nombreuses techniques de microfabrication, telles que le micro-fraisage de moules en métal ou la gravure ionique permettent de fabriquer des systèmes microfluidiques. Cependant, la fabrication de moules par microphotolithographie, puis la génération de systèmes en polymères coulés dans ces moules est une des techniques les plus répandues, et permet de produire en grande quantité et à faible coût des dispositifs contenant des motifs de taille millimétrique à micrométrique. On dénomme parfois cette technique *soft lithography* (Xia and Whitesides, 1998). Le matériel le plus souvent utilisé pour produire ces dispositifs est le polydiméthylsiloxane (PDMS) un élastomère de silicone, bien que d'autres matériaux soient parfois utilisés. Le PDMS combine une série d'avantages décisifs pour cet usage : il est relativement peu coûteux, reste longtemps liquide à température ambiante et sa réticulation s'effectue à une température peu élevée, de l'ordre de 70°C. Une fois réticulé, le PDMS est un matériau flexible, transparent, imperméable aux solutions aqueuses, perméable aux gaz, dont l'oxygène et la vapeur d'eau, et parfaitement biocompatible. Cela en fait un matériel idéal pour générer des systèmes de culture cellulaire, bien qu'il ait également des désavantages. Le PDMS réticulé rejette en effet des oligomères non polymérisés dans le milieu de culture, qui peuvent s'incorporer dans la membrane plasmique des cellules en culture (Regehr et al., 2009). Ce phénomène pourrait avoir un impact sur les propriétés membranaires des cellules, ainsi que sur le métabolisme de celles-ci. Il a également la propriété d'adsorber les petites molécules hydrophobes, telles que certains facteurs de croissance, depuis le milieu de culture. Ce dernier aspect pourrait avoir deux implications majeures dans l'utilisation de dispositifs en PDMS pour la culture cellulaire. Tout d'abord, la déplétion de certaines molécules du milieu pourrait modifier leur concentration au cours du temps, et donc fausser la comparaison avec des résultats obtenus dans d'autres systèmes de culture avec un rapport volume/surface distinct ou générés à partir d'autres matériaux. De plus, cette caractéristique pourrait perturber les études nécessitant l'exposition à certaines molécules pendant une durée déterminée. En effet, la concentration de ces molécules pendant la durée de traitement désiré pourrait tout d'abord chuter, puis les parois en PDMS pourraient réémettre le composé une fois le traitement retiré du milieu. Les systèmes microfluidiques de culture présentent donc des avantages certains sur leurs

prédécesseurs, mais certaines caractéristiques propres aux matériaux dont ils sont constitués doivent être prises en compte dans l'interprétation des résultats expérimentaux.

5) *Contrôle du microenvironnement cellulaire et cocultures tridimensionnelles*

L'avantage principal des systèmes de culture microfluidiques est de pouvoir contrôler le microenvironnement cellulaire avec une grande précision. Ils permettent en effet de générer des gradients de solutés, ou de reproduire la microarchitecture cellulaire d'un organe en agencant spatialement de façon contrôlée plusieurs types cellulaires. L'un des systèmes biomimétiques les plus polyvalents est basé sur la coculture de part et d'autre d'une membrane poreuse de différents types cellulaires. Cette membrane peut être physiquement déformée de façon contrôlée. Une des preuves de concept initiales de la viabilité de ce système a été la génération d'un modèle de poumon, contenant des cellules alvéolaires exposées à l'atmosphère d'un côté et des cellules endothéliales exposées à du sang de l'autre (Huh et al., 2010) (Fig 19). Ce type de système est appelé "organe sur puce" (*organ on a chip*), car permettant de reproduire des fonctions systémiques dans un dispositif miniaturisé. L'un des intérêts majeurs de ce système est de permettre l'utilisation de cellules humaines, et donc d'expérimenter sur des modèles d'organes humains, et à terme de permettre la génération d'organes sur puce à partir de cellules souches issues de patients. Ce dernier aspect répond à l'un des défis actuels de la biomédecine, qui est l'hétérogénéité des réponses individuelles aux pathologies et aux traitements. De plus, les cellules souches cultivées dans de tels systèmes de coculture se différencient mieux que dans les systèmes classiques, et s'auto-organisent spontanément pour former des tissus proches de ceux qu'on trouve dans un contexte physiologique (Ingber, 2018). Le système évoqué précédemment a été dérivé pour générer de multiples modèles de l'interface vasculaire d'organes, dont l'intestin (Kim et al., 2012) ou le rein (Musah et al., 2017). L'utilisation de membranes poreuses permet également de réaliser des modèles de barrière hémato-encéphalique, afin d'étudier la perfusion de solutés à travers celle-ci, permettant par exemple d'évaluer la biodisponibilité de molécules thérapeutiques ciblant le SNC (Booth and Kim, 2012). En plus de proposer une alternative éthique à l'expérimentation animale, ces systèmes permettent de disséquer avec une grande précision l'importance de types cellulaires distincts dans des phénomènes physiologiques et pathologiques, le rôle de stimuli mécaniques, et d'analyser en temps réel le sécrétome de ces cellules. Ils offrent l'avantage de fournir des résultats hautement

réplicables, et de répliquer des observations faites dans des modèles animaux ou chez l'humain (Ingber, 2018). La liste des systèmes de coculture contrôlée en trois dimensions et leurs divers apports à la recherche en biologie, déjà longue, ne cesse de s'étendre, et en faire une liste exhaustive serait hors sujet dans le présent manuscrit. Les systèmes de culture microfluidiques qui m'ont importé pendant ma thèse répondent à une problématique précise, celle du contrôle de la topologie des connexions de neurones en culture. Bien qu'ils ne permettent pas de modéliser l'interfaçage entre la circulation sanguine et d'autres médiums, ils permettent cependant de recréer les fonctions d'un organe, le cerveau, par la génération de micro-connectomes. On peut donc légitimement dénommer ces systèmes "cerveaux sur puces".

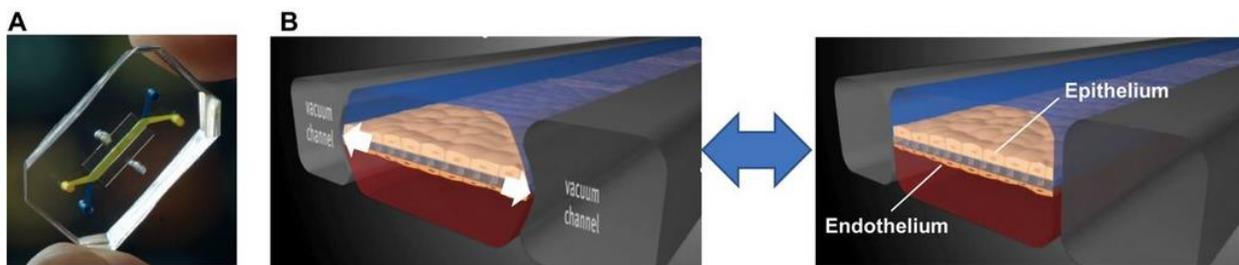


Figure 19 - Un exemple de plateforme versatile pour la production d'organes sur puce
 (A) Visualisation du système développé par la laboratoire de Donald Ingber, permettant la perfusion indépendante de deux compartiments micrométriques séparés par une membrane perforée. (B) Illustration de la déformation potentielle de la membrane perforée *via* des valves pneumatiques situées de part et d'autre de celle-ci. Des cellules épithéliales alvéolaires et endothéliales sont ensemencées de part et d'autre de la membrane, générant un organe sur puce imitant le poumon (Ingber, 2018).

6) Contraindre la pousse axonale dans des microcanaux

L'une des améliorations les plus notables faite à la chambre de Campenot depuis la preuve de concept initiale a été l'utilisation de la *soft lithography* pour générer des dispositifs permettant la compartimentalisation des axones de neurones en culture (Taylor et al., 2003). Ce système consiste en deux chambres de culture oblongues, de quelques centaines de microns de large et quelques dizaines de microns de haut, accessibles par deux puits situés à leurs extrémités. Ces deux chambres sont reliées par des microcanaux dont les dimensions ne permettent pas le passage des corps neuronaux, mais permettent aux axones de les traverser (Fig 20A). Ce système est compatible avec le micropatterning, une technique qui permet de déposer des molécules d'adhésion suivant un motif précis. L'un des deux compartiments peut être traité sélectivement si une surpression est maintenue

dans l'autre, car l'écoulement des liquides est très lent dans les microcanaux (Fig 20B). La description du système est affinée en 2005, avec la démonstration de ses applications pour la coculture de cellules dans les chambres, isolées fluidiquement mais liées par les axones poussant dans les microcanaux (Taylor et al., 2005). Une version améliorée de ce système permet de cocultiver deux populations neuronales connectées synaptiquement (Taylor et al., 2010; Virlogeux et al., 2018). Une chambre centrale située au milieu des microcanaux permet d'observer sélectivement les synapses, et de perfuser celles-ci avec une grande précision spatiale et temporelle.

Cependant, ce système présente un désavantage : les axones peuvent pousser dans les deux directions. Non seulement cette propriété ne reflète pas ce qui est observé dans le cerveau, où l'innervation entre deux structures est le plus souvent asymétrique, mais elle complique également l'interprétation des expériences. Si un traitement est appliqué dans la chambre A et un effet est observé dans les neurones de la chambre B, le vecteur est assurément le transport axonal, car les deux compartiments sont isolés fluidiquement. Cependant, le sens de ce transport est incertain : il pourrait tout aussi bien s'agir d'un transport antérograde des neurones A vers les neurones B, et donc d'une communication intercellulaire, que d'un transport rétrograde *via* les axones que les neurones B envoient vers le compartiment A, et donc sans communication intercellulaire. Plusieurs stratégies ont été proposées pour contraindre l'orientation des axones entre deux compartiments, ou pour générer des circuits neuronaux de topologie contrôlée. L'une des stratégies consiste à ensemercer en deux temps les deux chambres de culture, en comptant sur le fait que les microcanaux les reliant soient bouchés par les axones lors du deuxième ensemencement. Cependant, l'efficacité de cette stratégie n'a jamais été quantifiée dans des réseaux matures (connectés par des synapses fonctionnelles), et les expériences sont souvent pratiquées sur des réseaux immatures dans lesquels la deuxième population ensemencée n'a pas eu le temps de développer des prolongements axonaux (Freundt et al., 2012).

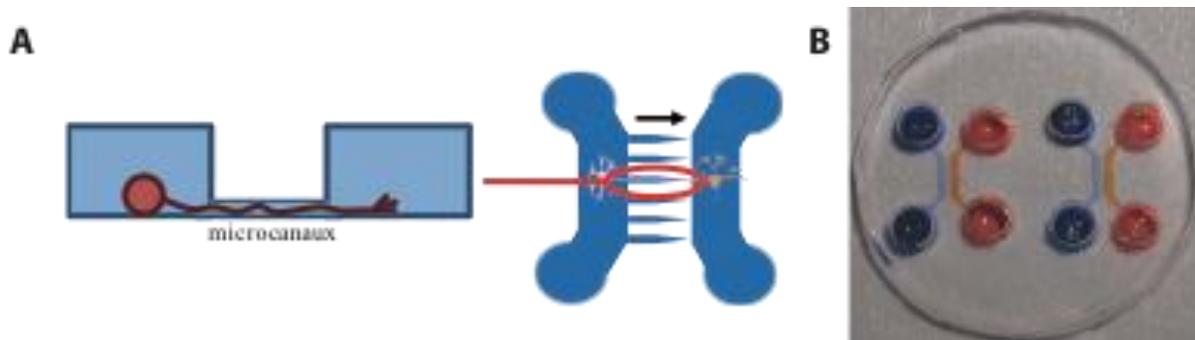


Figure 20 - Compartimentalisation axonale et fluidique

(A) Illustration du fonctionnement de microcanaux laissant sélectivement passer les axones et non les somas d'un neurone (en rouge) en culture. (B) Isolation fluidique entre les deux compartiments de circuits microfluidiques remplis avec des colorants de couleur distincte.

7) *Reconstruction de réseaux de neurones pour l'étude de la propagation de l'agrégation : dans la littérature*

Plusieurs études relatives à la propagation de protéines pathologiques (Calafate et al., 2015; Mao et al., 2016; Tran et al., 2014) utilisent un système microfluidique commercial sensé permettre d'étudier la propagation interneuronale d'agents pathogènes. Ce système contient trois chambres en série 1, 2 et 3 reliées par des microcanaux droits, chacune ensemencée avec des cultures neuronales (Fig 21). Les agrégats sont introduits dans la chambre 1, et les neurones dans la chambre 3 sont scrutés pour détecter des signes d'agrégation. Si l'agrégation de la protéine endogène est détectée dans la chambre 3, alors il est assumé qu'une propagation interneuronale de l'agrégation a bien eu lieu. En effet, les neurones des chambres 1 et 3 ne sont pas sensés envoyer leurs prolongements au-delà de la chambre 2, et ne sont donc pas sensés se connecter directement. Nous verrons dans la discussion de l'article 3 les problématiques liées à ces systèmes.

Il est donc nécessaire de pouvoir reconstruire des réseaux de neurones unidirectionnels pour étudier plus rigoureusement la propagation de protéines prion-like *in vitro*, et plusieurs approches expérimentales pourraient permettre de répondre à cette problématique.

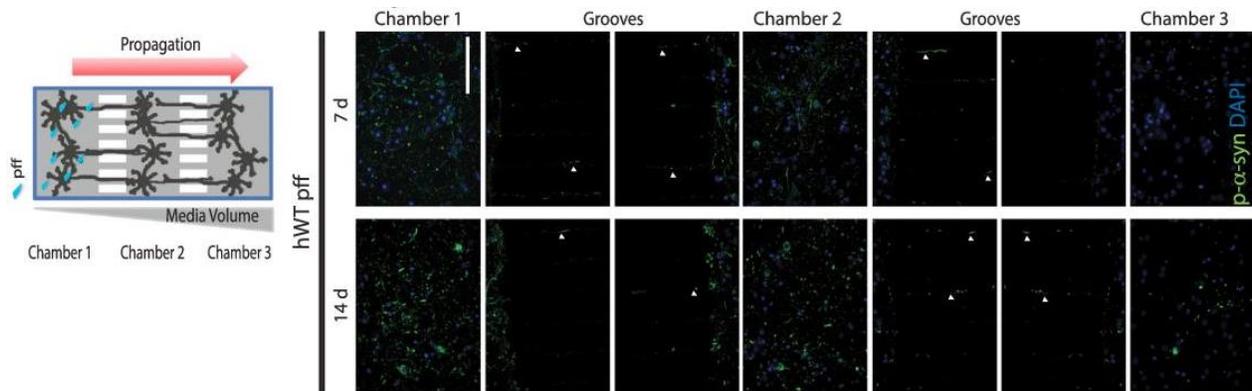


Figure 21 - Etude de la propagation de l'agrégation de l'aSyn dans des réseaux de neurones reconstruits dans un dispositif microfluidique

Schéma du dispositif : trois chambres en série reliée par des microcanaux permissifs à la pousse axonale et isolés fluidiquement grâce à un gradient de pression. L'introduction de PFFs dans la chambre 1 est suivie de la propagation de l'agrégation aux neurones de la chambre 3, aussi tôt que 7 jours post exposition (Tran et al., 2014). Bleu:DAPI ; Vert:pSyn. Barre d'échelle : 100um.

8) Contrôle de la topologie des réseaux de neurones par micropatterning

Le micropatterning permet de contraindre le site d'adhésion initial de neurones mis en culture, mais aussi les zones à travers lesquelles leurs neurites peuvent pousser. Un motif contenant des "îlots" sphériques permettant l'adhésion des corps cellulaires, reliés entre eux par de fines lignes permet de générer des réseaux dont la connectivité est partiellement contrainte, chacun des neurones ensemencés formant des synapses préférentiellement avec son plus proche voisin (Wyart et al., 2002). Dans ce système, la direction dans laquelle s'établit la connectivité n'est pas contrôlée. Afin d'y remédier, plusieurs équipes ont tenté de contraindre la polarisation neuronale en générant des lignes asymétriques partant d'un îlot sur lequel un neurone unique est déposé. Une des premières tentatives dans ce sens reposait sur la présence de trois lignes pointillées et d'une ligne continue, et permit de démontrer qu'il était possible d'influencer la polarisation neuronale par des contraintes adhésives : les 3/4 des neurones étendaient leur axone suivant la ligne continue (Stenger et al., 1998). D'autres méthodes ont depuis montré leur efficacité, telles que des gradients d'adhésion générés par des pointillés plus ou moins larges (Fricke et al., 2011), des lignes adhésives de largeur asymétrique (Tomba et al., 2014), ou encore des lignes ondulées ou rectilignes (Roth et al., 2012) (Fig 22B). Cette dernière technique permet la reconstruction de réseaux de neurones à connectivité contrainte. Le taux d'occupation des îlots reste cependant relativement bas dans de tels dispositifs. Une autre stratégie vise à orienter la connectivité entre des îlots sur lesquels plusieurs cellules sont

déposées, sans intervenir sur la polarisation de cellules uniques. L'organisation en série de triangles adhésifs permet en effet d'orienter la connectivité neuronale entre différents îlots (Albers and Offenhäusser, 2016; Feinerman et al., 2008) (Fig 22A). Les techniques de micropatterning présentent cependant quelques problèmes réduisant leur utilité pour l'étude la propagation d'agents pathogènes : 1) elles ne permettent pas la compartimentalisation fluïdique des somas et des axones des neurones en culture, et 2) les neurones déposés sur des micropatterns adhésifs ont tendance à former des clusters *via* la traction physique que leurs neurites exercent, et donc à perturber le patron de connectivité souhaité. Des avancées techniques récentes ont cependant laissé entrevoir la possibilité de maintenir des réseaux de neurones à connectivité contrôlée par micropatterning sur le plus long terme (Weydert et al., 2017).

Alternativement, l'utilisation de topographies structurales telles que des microsillons permet aussi de confiner le positionnement des neurones et leur connectivité. Cette technique a l'avantage sur le micropatterning de permettre une contrainte sur le long terme de l'architecture du réseau. Elle permet d'interfacer facilement des neurones sur des grilles de microélectrodes, rendant possible de mesurer et d'influencer avec une grande précision spatiale et temporelle l'activité neuronale. (Claverol-Tinturé et al., 2007, 2005; Maher et al., 1999; Zhou et al., 2015). Qui plus est, les microsillons sont compatibles avec la compartimentalisation fluïdique du système. En effet, la superposition d'un mur de polymère sur un microsillon ne bloque pas la pousse axonale et permet donc de perfuser séparément des sous-parties du réseau. Cependant, le guidage des neurites *via* cette technique n'est pas très contraignant, des molécules pro-adhésion étant déposées sur l'intégralité des surfaces accessibles au liquide (Yamada et al., 2016).

Plus récemment, une technique de positionnement neuronal permettant de contraindre très efficacement la topologie de réseaux a été proposée (Yamada et al., 2016). Cette technique, l'*in-mold patterning*, combine micropatterning et microsillons (Fig 22C), et a le potentiel de permettre la reconstruction de réseaux de topologie très contrôlée pendant de longues durées en combinant les avantages des deux techniques (Fig 22D). Cependant, la méthode de fabrication de tels dispositifs est longue et complexe, et n'a donc pas encore été adoptée par la communauté. Qui plus est, réaliser des cultures long terme avec de tels systèmes reste ardu, ce qui signifie que des

développements techniques demeurent un préalable nécessaire à leur utilisation pour l'étude de phénomènes lents tels qu'une propagation prion-like.

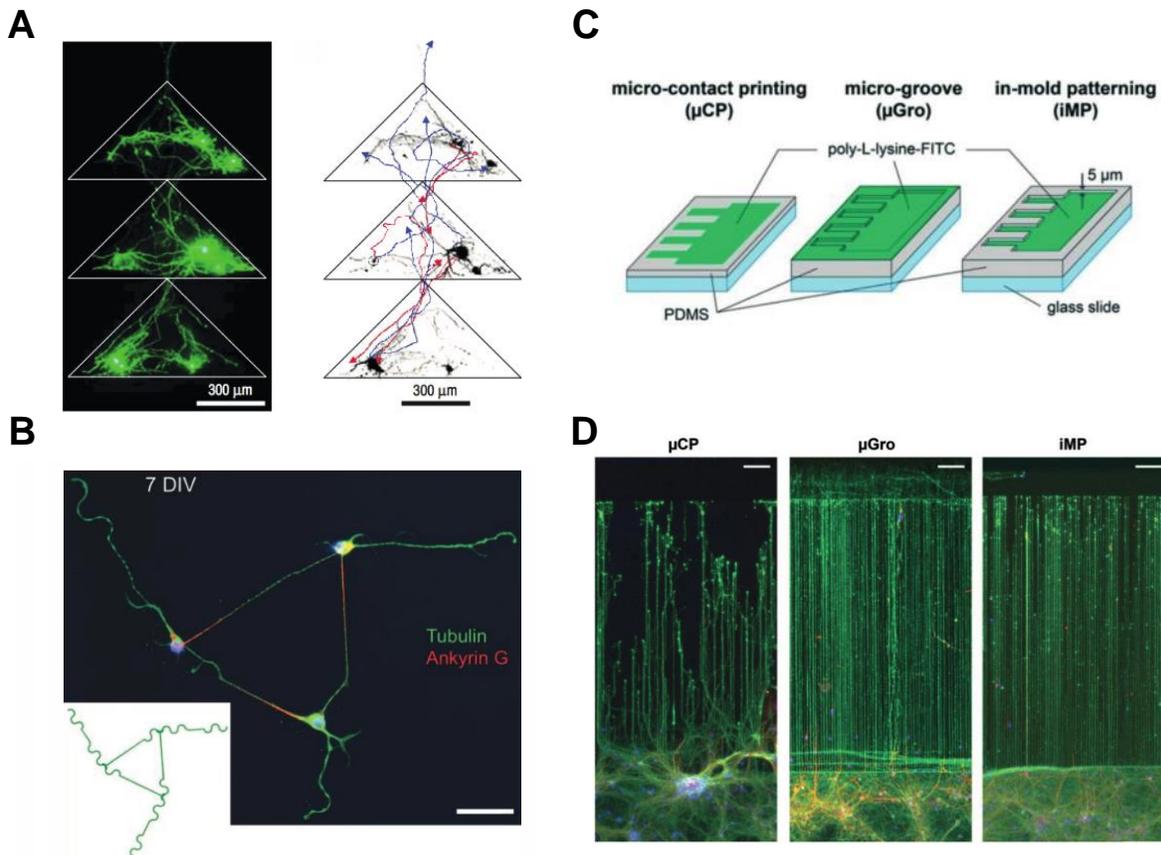


Figure 22 - Méthodes de micropatterning pour contrôler la topologie de réseaux de neurones *in vitro*

(A) Patterns adhésifs en triangles permettant l'orientation de la pousse axonale (Feinerman et al., 2008). En vert:GFP. (B) Reconstruction de réseaux de neurones avec des patterns de dépôt de molécules adhésives permettant l'orientation de la polarisation neuronale à l'échelle de la cellule unique (Roth et al., 2012). Barre d'échelle : 50um. (C) Comparaison des différentes méthodes de contrôle de la topologie neuronale (Yamada et al., 2016). (D) L'in-mold patterning est la plus efficace des trois méthodes présentées en (C) pour le contrôle de la pousse axonale. Vert:TUJ1 ; Rouge:MAP2 ; Bleu:DAPI (Yamada et al., 2016). Barre d'échelle : 100um.

9) Contrôle de la topologie des réseaux de neurones par des microcanaux asymétriques

Une stratégie plus simple à mettre en œuvre à grande échelle repose sur des microcanaux axonaux, comme ceux décrits par Taylor et al en 2003, mais de forme non rectiligne. Une forme asymétrique des microcanaux permet d'orienter la pousse des axones en jouant sur certaines propriétés des axones. Les systèmes de culture fabriqués de cette façon sont aisés à produire : tous les motifs

structuraux (chambres de culture + microcanaux) sont situés sur le même bloc de PDMS, et une fois des ouvertures pratiquées aux extrémités de chaque chambre, ce bloc peut être attaché à une lamelle de verre compatible avec des objectifs de microscopie à courte distance focale. Il n'y a donc besoin que d'un seul moule, plusieurs dispositifs peuvent être positionnés dessus, et il n'y a pas de nécessité d'aligner avec précision des motifs de taille milli-ou micrométrique.

La première tentative d'influencer la pousse axonale suivant une telle stratégie a été proposée en 2011 par Peyrin et al, et reposait sur l'utilisation de microcanaux axonaux en entonnoir. La partie la plus large (15µm) permet de récolter des axones de la chambre A, et se rétrécit progressivement (3µm) jusqu'à atteindre la chambre B : ainsi, les axones allant de A vers B ne rencontrent pas d'obstacles abrupts à leur croissance, tandis que les axones de la chambre B migrent plus difficilement vers la chambre A (Fig 23A). Ce dispositif, appelé système "diodes" dans la suite de ce manuscrit, permet une filtration axonale de l'ordre de 95%, c'est à dire que 20 fois plus d'axones poussent de A vers B que de B vers A quand des neurones sontensemencés uniquement dans l'une des chambres (Peyrin et al., 2011). Il s'agit du premier système que j'ai utilisé dans mes expériences. La communication neuronale se propage de façon quasi unidirectionnelle dans ce système (Renault et al., 2015). Les autres tentatives communiquées depuis lors ont utilisé des microcanaux contenant des barrières inclinées (le Feber et al., 2015) (Fig 22B), des triangles successifs ressemblant aux motifs de micropatterning évoqués plus haut (Gladkov et al., 2017) (Fig 22D), ou des microcanaux "arches" incurvés disposés sur les bords des microcanaux reliant les compartiments (Fig 22C). Ce dernier type de filtration repose d'une part sur les propriétés mécaniques des axones (en l'occurrence leur résistance à la flexion qui les empêche de se courber au-delà d'un seuil donné), et d'autre part à leur adhésion sélective aux coins des microcanaux rectangulaires, riches en signaux adhésifs (Renault et al., 2016). Cette approche est celle que j'ai adaptée pour mes besoins dans la seconde partie de ma thèse. Ces approches ont été déclinées par plusieurs groupes (Holloway et al., 2019), certains démontrant la propagation unidirectionnelle du signal dans ces systèmes et donc la possibilité de générer des circuits complexes (Forró et al., 2018). Cependant, aucun des systèmes présentés n'a démontré la possibilité de réaliser des réseaux 100% orientés. Une autre approche proposée par le groupe de Noo Lee Jeon exploite la "mémoire de forme" des axones et a permis de générer des réseaux 100% orientés, mais la longueur extrême de microcanaux (plus de 1000µm) et

leur faible densité (1 canal tous les 500 μ m) diminue fortement leur utilité dans un cadre expérimental (Na et al., 2016) (Fig 22E). Alternativement, des électrodes sous tension peuvent inhiber la pousse axonale (Honegger et al., 2013), et une stratégie reposant sur leur mise sous tension dynamique a été proposée pour orienter la connectivité de cultures compartimentalisées (Honegger et al., 2016). L'efficacité reproductible de tels systèmes sur des cultures long terme reste cependant à démontrer.

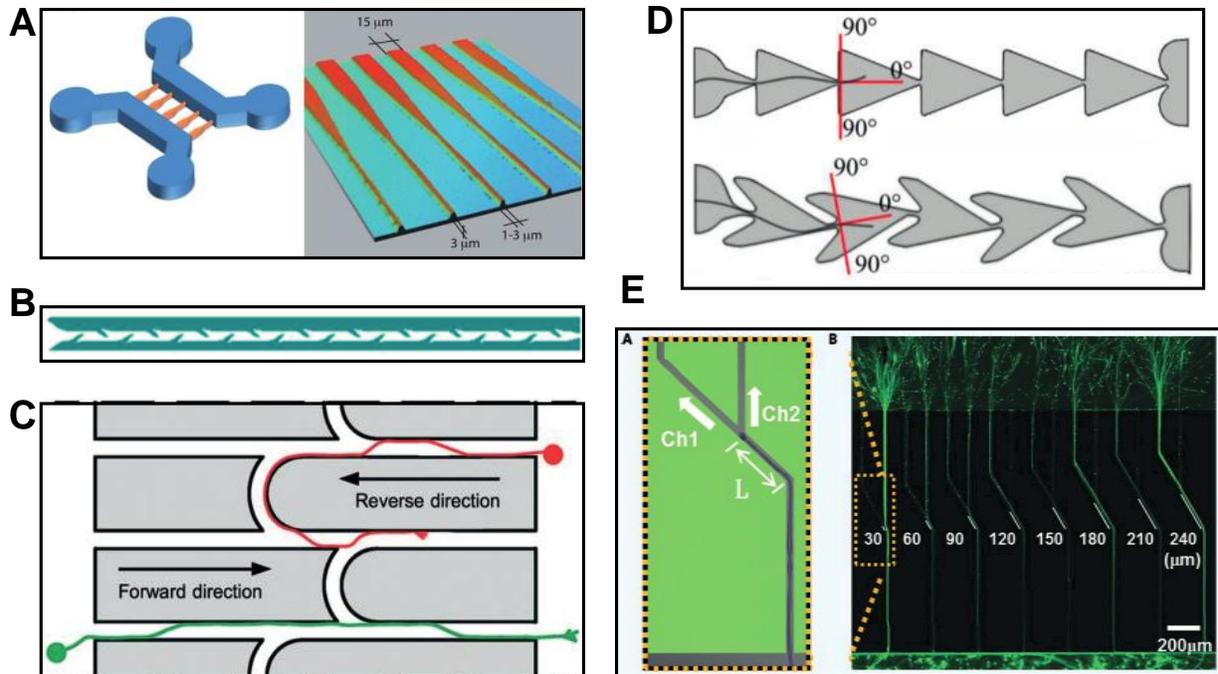


Figure 23 - Designs de microcanaux asymétriques pour orienter la pousse axonale

(A) Microcanaux en "entonnoirs", dits "diodes" (Peyrin et al., 2011). (B) Microcanaux à barrières inclinées (le Feber et al., 2015). (C) Microcanaux de type "arches" (Renault et al., 2016). (D) Microcanaux en entonnoirs successifs (Gladkov et al., 2017). (E) Microcanaux reposant sur la "mémoire de forme" axonale (Na et al., 2016).

10) Conclusion

Il n'existait donc pas, au début de ma thèse, de système satisfaisant le cahier des charges permettant d'étudier la propagation prion-like de protéines dans des réseaux de neurones reconstruits. En effet, aucun des systèmes évoqués précédemment ne permet de reconstruire de réseau de neurones connectés de façon totalement unidirectionnelle sur le long terme, et avec une innervation correcte de la chambre postsynaptique. J'ai donc développé et utilisé un tel système au cours de ma thèse, en combinant des microcanaux de type "arches" avec des constriction.

Méthodes

Culture cellulaire primaire

Le protocole de préparation de cultures primaires de neurones murins est disponible dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article 1 *"Neuronal alpha-synuclein expression levels in different cell populations is the primary determinant of the prion-like spread of the fibrillar form of the protein."* Brièvement, les microstructures extraites d'embryons de souris à E14 ou E16 sont dissociées chimiquement puis mécaniquement, avant d'être introduites à la concentration désirée dans les dispositifs de culture.

Systèmes microfluidiques

Les protocoles pour la préparation des moules initiaux par microphotolithographie, la préparation de moules en résine et la fabrication des puces microfluidiques sont disponibles dans l'article 2 *"Reconstruction of directed neuronal networks in a microfluidic device with asymmetric microchannels"*.

Brièvement, le design est tracé avec le logiciel de dessin industriel QCAD, et un masque opaque avec les motifs transparents est préparé par une entreprise tierce (Selba, Suisse). Le masque est utilisé pour exposer et durcir spécifiquement les régions désirées d'une couche de résine photosensible à la lumière. Les parties non durcies sont ensuite ôtées. Le moule initial ainsi généré permet la fabrication de blocs de PDMS contenant les motifs structuraux désirés. Ces blocs sont assemblés avec des lamelles de verre grâce à un traitement de surface par un générateur de plasma.

Agrégats préformés d'aSyn

Le processus de fabrication des agrégats d'aSyn utilisés dans cette étude sont décrits dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article 1 *"Neuronal alpha-synuclein expression levels in different cell populations is the primary determinant of the prion-like spread of the fibrillar form of the protein."*, ainsi que dans Ghee et al 2005.

Brièvement, l'aSyn est exprimée dans des cultures bactériennes, purifiée par chromatographie sur colonne, puis incubée sous agitation dans un tampon salin, avant que les espèces agrégées soient à leur tour purifiées puis complexées avec une sonde fluorescente de type atto.

Immunomarquage & Anticorps

Le protocole d'immunomarquage et de fixation des cultures est décrit dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article 1 "*Neuronal alpha-synuclein expression levels in different cell populations is the primary determinant of the prion-like spread of the fibrillar form of the protein.*".

Les anticorps utilisés dans ce manuscrit sont indiqués dans le tableau suivant :

Cible	Isotype	Fournisseur	Référence
MAP2 (clone HM-2)	Souris IgG1	Sigma	M9942
TUJ1	Souris IgG2b	Sigma	T5076
pSyn	Lapin IgG	Abcam	52964
pSyn	Lapin IgG	Abcam	51253
pSyn (clone 81A)	Souris IgG2a	Abcam	184674
pSyn (D1R1R)	Lapin IgG	Cell Signaling	23706
aSyn (C20R)	Lapin IgG	Santa Cruz	7011 (plus produit)
aSyn (116-131)	Mouton	Abcam	6162
aSyn (clone 42)	Souris IgG1	BD Biosciences	610786
Bassoon	Souris IgG2a	Abcam	SAP7F407

Microscopie

Les microscopes utilisés dans ces études sont décrits dans la partie "Matériel & Méthodes" des articles 1 "*Neuronal alpha-synuclein expression levels in different cell populations is the primary determinant of the prion-like spread of the fibrillar form of the protein.*" et 3 "*Alpha-synuclein propagation in fully oriented in vitro neural networks suggests non-synaptic transfer mechanisms.*".

Analyse d'image automatique

Les images ont été analysées grâce à des macros développées sur le logiciel Fiji (Schindelin et al., 2012).

Détection automatique de somas

La détection automatique du contour des somas dans des images de phase a été réalisée grâce à un algorithme de type "*Mask R-CNN*" (pour *region-convoluted neural network*) pour la segmentation et la détection d'objets. L'algorithme utilisé pour ces analyses d'images a été adapté à partir des travaux de He et al 2017 (He et al., 2017), et la version Python est disponible à l'adresse suivante : https://github.com/matterport/Mask_RCNN. Le set d'apprentissage a consisté en 1400 somas de neurones tracés à la main sur 350 images de phase. 150 itérations ont été nécessaires pour que la détection de somas soit satisfaisante. Les régions d'intérêt ont été validées manuellement après détection par l'algorithme. La détection automatique de somas a été utilisée dans l'article 3 "*Alpha-synuclein propagation in fully oriented in vitro neural networks suggests non-synaptic transfer mechanisms.*", pour évaluer la fixation directe et la dissémination des agrégats exogènes fluorescents.

Western blot

Le protocole de préparation des Western blots est donné dans la partie "Matériel & Méthodes" de l'article 1 "*Neuronal alpha-synuclein expression levels in different cell populations is the primary determinant of the prion-like spread of the fibrillar form of the protein.*".

Résultats

L'objet de cette thèse a été d'étudier les déterminants du tropisme de l'agrégation de l'aSyn pour des populations neuronales particulières lors de sa propagation dans des réseaux neuronaux. Dans un premier lieu, j'ai abordé la vulnérabilité intrinsèque de populations neuronales directement exposées à des agrégats exogènes d'aSyn. J'ai ensuite développé un système de microcanaux asymétriques pour reconstruire des réseaux de neurones orientés, et ai étudié la propagation de l'agrégation de l'aSyn au sein de ces réseaux.

En annexe sont disponibles deux autres publications auxquelles j'ai participé. La première d'entre elles est un article portant sur la propagation d'une toxine dans des réseaux de neurones reconstruits, la deuxième est une revue portant sur les mécanismes de propagation intercellulaire des prions.

Validation de la spécificité d'anticorps anti-pSyn

Avant de réaliser mes expériences, j'ai vérifié la spécificité de la méthode de marquage employée pour détecter les agrégats d'aSyn endogène. En effet, peu avant le début de ma thèse, une publication a remis en cause la spécificité d'un des anticorps les plus fréquemment utilisés pour marquer la forme phosphorylée sur la sérine 129 de l'aSyn, qui est particulièrement enrichie dans les inclusions pathologiques de la protéine (Sacino et al., 2014c). J'ai utilisé un protocole de fixation/extraction : l'ajout d'un détergent dans le milieu de fixation permet d'éliminer les protéines solubles, et donc de ne conserver que les protéines insolubles. Ce protocole m'a permis de vérifier que dans les cultures exposées à des agrégats exogènes, les objets marqués par l'anticorps anti-aSyn phosphorylée en sérine 129 (pSyn) étaient également marqués par des anticorps ciblant l'aSyn (Fig 24A). Seuls ceux visant la partie Cter étaient en mesure de marquer les inclusions, un anticorps ciblant la partie centrale de l'aSyn ne les marquant pas (Fig 24A, 24B, 24C). Ces observations suggèrent que cet épitope est inaccessible ou modifié dans la forme agrégée de la protéine, en accord avec la structure des fibres amyloïdes (Fig 10C). Il est apparu que les agrégats d'aSyn endogènes étaient autofluorescents dans le bleu, une propriété dont je n'ai pas trouvé trace dans la littérature (Fig 24A). J'ai également testé une série d'anticorps anti-pSyn sur

des cultures exposées ou non à des agrégats d'aSyn murine de type *Fibrils* (mFib) (Bousset et al., 2013b). Deux d'entre eux ne génèrent par de marquage dans les cultures non exposées, j'ai donc réalisé l'intégralité de mes expériences avec ceux-ci (Fig 25). Les deux autres anticorps que j'ai testés ont générés deux types de marquages distincts dans les cultures contrôles : le clone 81A, décrit dans l'étude citée précédemment, génère un marquage d'apparence neuritique, en accordance avec le rapport de son affinité pour la forme phosphorylée des neurofilaments légers. Ce marquage est également présent dans des cultures KO pour l'aSyn (Fig 26). L'anticorps D1R1R génère quant à lui un marquage somatique/nucléaire absent des cultures KO pour l'aSyn, ce qui suggère qu'il ait une affinité pour l'aSyn non phosphorylée, ou pour une conformation de l'aSyn phosphorylée présente dans les cultures non exposées à des agrégats. De façon intrigante, ces deux anticorps moins spécifiques semblent révéler beaucoup plus d'objets pSyn+ dans les cultures exposées (Fig 25), ce qui laisse supposer que divers agrégats coexistent dans les cultures exposées aux mFib, et que ces agrégats présentent des épitopes distincts à leur surface.

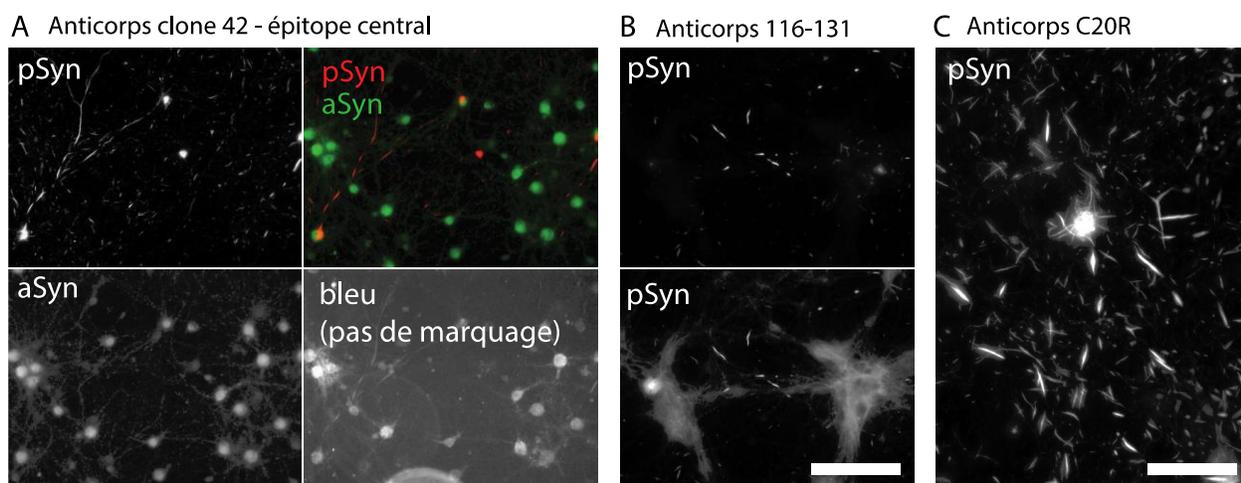


Figure 24 - Validation de la spécificité d'anticorps anti-pSyn pour les inclusions insolubles d'aSyn

Des cultures primaires hippocampales murines ont été fixées, 14j après l'exposition à DIV7 à 100nM de fibres d'aSyn murine (mFib), avec une solution contenant un détergent et lavant les protéines solubles. 3 anticorps anti-aSyn ont été utilisés en conjonction avec l'anticorps #59264 ciblant pSyn. (A) Un anticorps ciblant la partie centrale de l'aSyn ne génère pas de marquage des inclusions pSyn+. Les agrégats d'aSyn endogènes sont auto fluorescents dans le bleu. (B & C) Deux anticorps visant la partie Cter de l'aSyn marquent les inclusions insolubles. (A & B) Barre d'échelle 100um. (C) Barre d'échelle : 50um.

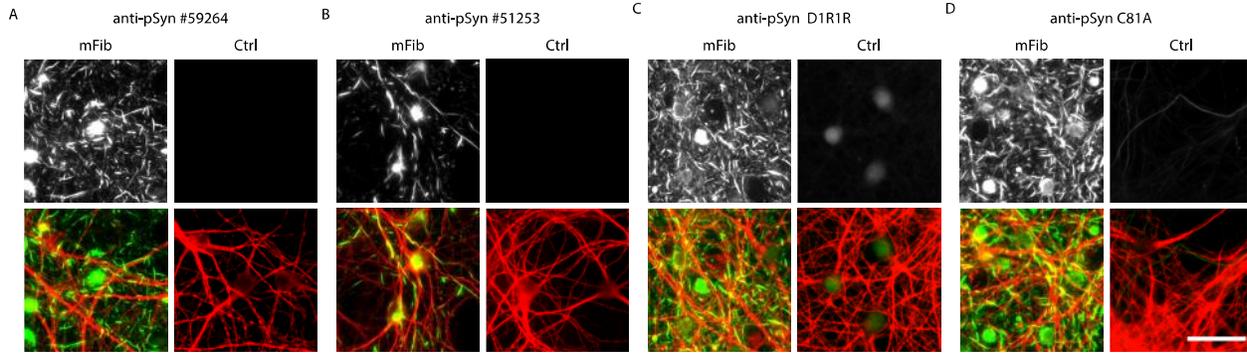


Figure 25 - Validation de la spécificité d'anticorps anti-aSyn phosphorylée (pSyn)

4 anticorps ciblant la forme phosphorylée de l'aSyn ont été appliqués sur des cultures primaires hippocampales murines exposées ou non à 100nM (moles de monomères) de mFib pendant 14j à partir de DIV7. (A & B) Les anticorps #59264 et #51253 (Abcam) ne génèrent pas de signal dans les cultures non exposées aux mFib, (C & D) tandis que les anticorps D1R1R (Cell Signaling) et C81A (Abcam) génèrent un marquage dans les cultures non exposées. Vert:pSyn ; Rouge:MAP2. Barre d'échelle : 50um.

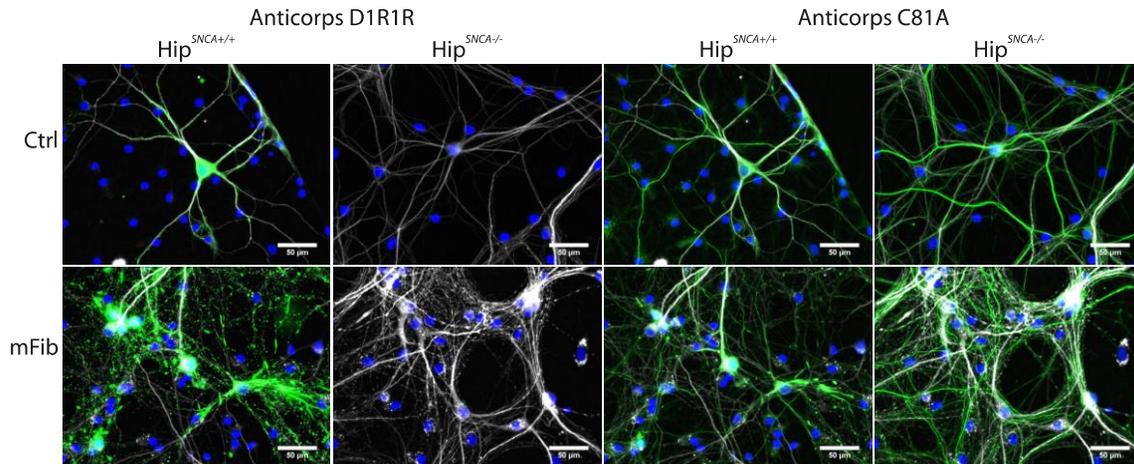


Figure 26 - Validation de la spécificité pour l'aSyn de deux anticorps anti-pSyn

Les anticorps D1R1R et C81A ont été appliqués à des cultures primaires exprimant ou non l'aSyn et exposées ou non à 100nM de mFib pendant 14j à partir de DIV7. Gris:MAP2 ; Vert:pSyn ; Bleu:DAPI. Barre d'échelle : 50um.

Article 1 - Vulnérabilité spécifique de populations neuronales - publication soumise à Scientific Reports

Introduction

L'un des facteurs pouvant participer à la génération d'un patron d'agrégation de l'aSyn ne corrélant pas avec la connectivité des régions cérébrales est la vulnérabilité intrinsèque des populations neuronales à l'agrégation induite par des agrégats seedants. Pour évaluer si la vulnérabilité intrinsèque de différentes régions cérébrales différait, j'ai comparé la quantité d'inclusions d'aSyn se développant dans des cultures primaires extraites de différentes régions du SNC d'embryons de souris. J'ai généré des cultures striatales, corticales et hippocampales de souris WT, que j'ai exposées à des fibres préformées d'aSyn. J'ai évalué dans ces différentes cultures la fixation des fibres préformées et la quantité d'inclusions endogènes s'y développant. J'ai également généré des cultures exprimant l'aSyn à des niveaux distincts pour évaluer l'impact de son expression sur la fixation des agrégats exogènes et la génération d'inclusions endogènes.

Neuronal alpha-synuclein expression levels in different cell populations is the primary determinant of the prion-like spread of the fibrillar form of the protein

Courte J^{1,3}, Bousset L^{2*}, Von Boxberg Y^{1*}, Villard C³, Melki R², Peyrin JM¹

¹ Sorbonne Universités, Faculté des Sciences et Technologie, CNRS UMR 8246, INSERM U1130, Neurosciences Paris Seine, Institut de Biologie Paris Seine, Paris, 75005, France.

² Laboratory of Neurodegenerative Disease, Institut François Jacob, MIRCen, CEA-CNRS, Fontenay aux Roses 92265, France

³ Physico-Chimie Curie, Université PSL, CNRS, Institut Pierre-Gilles de Gennes pour la Microfluidique, Paris, France.

* Equal contribution

Courte J: josquin.courte@gmail.com

Bousset L: luc.bousset@cnrs.fr

Von Boxberg Y: ysander.von_boxberg@upmc.fr

Villard C : catherine.villard@curie.fr

Melki R : ronald.melki@cnrs.fr

Peyrin JM (Corresponding author): jean-michel.peyrin@upmc.fr

Background: Alpha-synuclein (aSyn)-rich aggregates propagate in neuronal networks and compromise cellular homeostasis leading to synucleinopathies such as Parkinson's disease. Aggregated aSyn spread follows a conserved spatio-temporal pattern that is not solely dependent on connectivity. Hence, the differential tropism of aSyn-rich aggregates to distinct brain regions or their ability to amplify within those regions must contribute to this process.

Methods: To better understand what underlies aSyn-rich aggregates distribution within the brain, we generated primary neuronal cultures from various brain regions of wild-type mice and exposed them to fibrillar aSyn. We then assessed exogenous fibrillar aSyn uptake, endogenous aSyn seeding, and endogenous aSyn physiological expression levels. We then performed the same analyses on primary neuronal cultures generated from mice with a reduced aSyn expression level.

Results: Despite a similar uptake of exogenous fibrils by neuronal cells from distinct brain regions, the seeded aggregation of endogenous aSyn differed greatly from one neuronal population to another. We assessed aSyn expression level in the different neuronal cultures and determined that the difference in the seeding propensity of fibrillar aSyn was dependent on aSyn expression level. Using primary neurons from *SNCA*^{-/-} and *SNCA*^{+/-} mice embryos, we further demonstrated that aSyn expression level alone defines exogenous fibrillar aSyn seeding efficiency.

Conclusions: Our data establish that endogenous aSyn expression level plays a key role in fibrillar aSyn prion-like spread. Besides allowing a better understanding of aSyn aggregates spread determinants in brain networks, our observations further suggest that endogenous aSyn expression levels possibly play a role in selective regional brain vulnerability.

Keywords: alpha-synuclein, prion-like, primary neuronal cultures, regional vulnerability, aggregation, spread, cellular tropism

Background

aSyn is abundantly expressed in neurons (Kahle et al., 2000), and mostly localizes at synapses where it regulates presynaptic vesicles turnover (Emanuele and Chierigatti, 2015). aSyn is also a constituent of Lewy bodies and neurites (Spillantini et al., 1997), also named Lewy pathology (LP), the hallmarks of a group of neurodegenerative diseases named synucleinopathies that comprise Parkinson's disease (PD), multiple system atrophy (MSA), and dementia with Lewy bodies (DLB) (Goedert et al., 2017b; Goedert and Spillantini, 1998). The protein is phosphorylated at Ser129 (pSyn) (Fujiwara et al., 2002b) and ubiquitinated (Hasegawa et al., 2002) in aSyn-rich pathogenic protein and lipid deposits (Shahmoradian et al., 2019a). The spatio-temporal spread of LP in the brain of PD patients proposed by Braak and co-workers (Braak et al., 2004; Heiko Braak et al., 2003) together with the finding that LP affect young healthy neuronal grafts in the brain of PD patients (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008b), led to hypothesize that LP have prion-like propensity. This led numerous groups to inject aSyn assemblies made de novo or brain homogenates containing LP into the CNS of model animal and the demonstration that those assemblies trigger LP (Luk et al., 2012b, 2012a; Masuda-Suzukake et al., 2013; Mougenot et al., 2012; Paumier et al., 2015; Peelaerts et al., 2015; Recasens et al., 2014, 2014; Rey et al., 2018, 2016; Sacino et al., 2014b; Shimozawa et al., 2017) and have prion-like propensity (reviewed in (Brundin and Melki, 2017)). Importantly, the spatio-temporal pattern of LP matched the symptoms observed in patients (Schapira and Tolosa, 2010; Sveinbjornsdottir, 2016).

How aSyn assemblies spread from neuron to neuron and amplify is not yet fully understood. A number of steps have been nonetheless identified and documented. The first step is the uptake of exogenous seeds from the extracellular space by neuronal cells, possibly through receptor-mediated non-conventional endocytosis (Holmes et al., 2013; Ihse et al., 2017; Lee et al., 2008a; Mao et al., 2016; Shrivastava et al., 2015). Following uptake, the seeds have been shown to reach the cytosol by escaping from the endolysosomal compartment (Flavin et al., 2017; Freeman et al., 2013; Jiang et al., 2017). Within the cytosol, exogenous aSyn seeds grow by recruiting endogenous monomeric aSyn (Bousset et al., 2013a; Fares et al., 2016; Luk et al., 2009; Volpicelli-Daley et al., 2014, 2011; Wood et al., 1999). This step is highly dependent on the expression of aSyn (Wood et al., 1999). They are also actively transported within endosomes or naked anterogradely and retrogradely and

are released in the extracellular milieu (Alvarez-Erviti et al., 2011; Brahic et al., 2016; Fontaine et al., 2016; Freundt et al., 2012; Gribaudo et al., 2019; Jang et al., 2010; Lee et al., 2008a; Rey et al., 2013)

LP sequential development in model animals brains follows interconnected brain regions (Luk et al., 2012a; Peelaerts et al., 2015; Rey et al., 2018, 2016; Shimozawa et al., 2017) and suggests trans-synaptic transfer, although it is important to note that the exact role of synaptic elements in mediating propagation is yet to be addressed. Intriguingly, LP spread pattern does not fit the synaptic weights within the sequentially affected regions (Surmeier et al., 2017), suggesting that synapses density alone does not define the selective vulnerability of different brain regions in distinct synucleinopathies. It is thus of prime importance to determine what factors govern selective tropism and subsequent vulnerability in order to better understand disease progression in the brain of patients. We can reasonably hypothesize that tropism and vulnerability are defined by specific characteristics of the neuronal cells constituting different brain areas and sub-areas. These characteristics are many and range from cell surface properties, endo- and exocytosis activities, the extracellular matrix, membrane proteins and phospholipid composition of the plasma membrane protein to the distinct proteomes of different neuronal cells.

Here we assess the tropism of the aSyn fibrillar polymorph “Fibrils” for primary striatal (Str), cortical (Cx) and hippocampal (Hip) neurons derived from wild-type (WT) and *SNCA*^{-/-} mouse embryos. We show that different neurons types bind and take up fluorescently labelled aSyn Fibrils to similar extents. We demonstrate nonetheless that the extent to which exogenous aSyn Fibrils seed the aggregation of endogenous aSyn is dependent on the origin of neuron population. This prompted us to compare aSyn expression level and sub-cellular localization in different neuronal populations and exogenous fibrils seeding propensity in those neurons. We report that aSyn expression level and sub-cellular localization differs in neurons of different origins and that the differences we observe correlate with exogenous aSyn Fibrils seeding propensity within those neurons. To strengthen this finding, we selectively decreased aSyn expression level in Hip neurons by crossbreeding WT and *SNCA*^{-/-} mice to generate *SNCA*^{+/-} heterozygous embryos. aSyn expression level in *SNCA*^{+/-} heterozygous Hip neurons was lower than that in WT Hip neurons as

was the seeding propensity of exogenous aSyn Fibrils in those cells. Taken together, our data suggest that the expression level of aSyn is key in aSyn prion-like spread.

Methods

Microfluidic culture devices preparation

Primary neuronal cultures were established in custom-made microfluidic chips, for a diminished consumption of cells and reagents per replicate and longer culture duration. These microfluidic culture chips were made of a polydimethylsiloxane (PDMS, Dow Corning) part, bonded after plasma treatment to a microscope compatible glass coverslip (Dutscher). PDMS cell culture chambers were 800 μ m wide, 4mm long and 50 μ m high, and accessible through two inlets. Master mold preparation, plasma bonding and surface coating of microfluidic chips by 10 μ g/mL poly-D-lysine were performed as previously described (Lassus et al., 2018a). Culture systems were then additionally coated with 2.5 μ g/mL of laminin (Sigma) for 6 hours.

For biochemical analysis, neurons were plated in conventional 24-wells culture systems (VWR), coated following the same protocol as microfluidic culture devices.

Microfluidic chips for co-culturing neuronal populations in two separate chambers connected with microchannels for directed axonal growth (see sketch in Supp Fig 5A) were prepared as previously described (Lassus et al., 2018a).

Primary neuronal cultures

Swiss and C57BL6N mice E14.5-E16.5 embryos (Janvier Labs) were used for WT primary cultures generation. For *SNCA*^{-/-} cell culture generation, we used embryos from C57BL6jOlahsd mice (Envigo) exhibiting a spontaneous deletion of the *SNCA* locus (Specht and Schoepfer, 2001). *SNCA*^{+/-} embryos were obtained by crossbreeding C57BL6N and C57BL6jOlahsd mice.

Structures obtained by microdissection were rinsed with Gey's Balanced Saline Solution (Thermo Fisher). They were then incubated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life

Technologies) containing papain (Sigma) for 10 minutes at 37°C. Enzymatic activity was then inhibited by addition of 10% fetal calf serum (FCS, GE Healthcare). Enzyme-containing solution was replaced by DMEM containing DNase type I (Sigma) and structures were mechanically dissociated with a pipette. After several rounds of rinsing, cells were re-suspended in culture medium (91% High glucose GlutaMax supplemented DMEM, 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin 1000U/ml, 1% N2 Supplement and 2% B27 Supplement (Life Technologies)) at 20 million cells per ml. 1.5µl of cell suspension was injected in microfluidic cell culture chambers, and left to adhere for a few minutes before cell culture medium addition. Microfluidic chips were stored in a petri dish containing 0.5% Ethylene-diamine-tetra-acetic acid in water, allowing for reduced evaporation of culture medium while preventing bacterial growth.

Cells were maintained at 37°C, 5% CO₂ in a humidified atmosphere, and half of the medium was renewed every week. Culture medium was completely renewed when treatment was performed.

Fibrils preparation

The expression, purification of mouse monomeric WT aSyn and its assembly into the fibrillar polymorph Fibrils were carried out as previously described (Bousset et al., 2013a; Ghee et al., 2005). aSyn Fibrils in 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM KCl were pelleted and washed with PBS buffer, pH 7.4 twice. aSyn Fibrils were labelled with a 2 molar excess of NHS-ester ATTO 550 (AttoTec) according to the manufacturer's recommendations. The labelling reaction was stopped by addition of Tris, pH 7.5 to a final concentration of 1mM. The unreacted fluorophore was removed by two cycles of centrifugations at 15,000g for 10 minutes and resuspension of the pelleted fibrils in PBS, pH 7.4. The fluorescently labelled aSyn Fibrils 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). The fragmented, fluorescently labelled, aSyn Fibrils were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until they were used. All aSyn fibrillar assemblies were imaged before and after fragmentation by transmission electron microscopy after adsorption of 200 mesh carbon coated electron microscopy grids and negative staining with 1% uranyl acetate. Length distribution of the fragmented fibrils

were performed and are represented as histograms where the number of fibrils analysed is indicated.

Cells exposure to Fibrils

The frozen, fragmented, fluorescently labelled, aSyn Fibrils were thawed in a 37°C water bath immediately before use and extemporaneously diluted in neuronal cell culture medium. All procedures were conducted under a vertical laminar flow culture hood and Fibrils containing liquids as well as potentially contaminated surfaces and objects were treated/cleaned with a 1% sodium dodecyl sulfate solution, as recommended in (Fenyl et al., 2018).

Cells fixation and staining

Cells were fixed with a 4% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Science), 4% sucrose (Sigma) phosphate buffered saline (PBS, Thermo Fisher) solution. Saturation and permeabilization were performed simultaneously with a 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma) 0.2% Triton X-100 (Sigma) PBS solution for 30min at RT. Antibodies were diluted in 1% BSA PBS solution. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. C20R antibody from Abcam diluted at 1/1000 was used to stain endogenous aSyn, antibodies 59264 and 51253 from Abcam were used to stain phosphorylated aSyn (pSyn), anti-microtubule associated protein 2 (MAP2) HM-2 clone antibody from Sigma was used at 1/500, anti- β -III-tubulin (TUJ1) clone SDL.3D10 from Sigma was used at 1/1000, anti-CD68 clone FA-11 from Abcam was used at 1/1000 to stain microglia, and anti-GFAP Z0334 from Dako was used at 1/500 to stain astrocytes. Secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488, 555 or 633 (Thermo Fisher) were used at 1/500 and incubated 1 hour and a half at room temperature. Hoechst probe (Sigma) was incubated at the same time as secondary antibodies, at a concentration of 1/5000. Cells were washed between each step with a 1% BSA PBS solution, and were stored in a 0.1% azide (Sigma) PBS solution for preventing bacterial growth.

Image acquisition and analysis

Image acquisition was performed with an Axio-observer Z1 (Zeiss) fitted with a 20X N.A. 0.5 objective (Zeiss) and a cooled CCD camera (ORCA-Flash 4, Hamamatsu, Coolsnap HQ2, Roper

Scientific, Metamorph software (Molecular Imaging)). On average, 5 random visual fields were acquired per microfluidic culture chamber. Image analysis was performed with Fiji software (Schindelin J 2012). In order to have all objects in focus in each field, 4 acquisitions were made, each distant by 2µm in z. Images were then combined using the Z project function of Fiji. In order to normalize background signal, images were pre-treated with the Subtract Background function of Fiji, radius 500 pixels for MAP2 signal and 5 pixels for pSyn signal. pSyn neuronal burden analysis was performed by computing the ratio of pSyn area over MAP2 area at fixed thresholds. aSyn subcellular localization analysis was performed by measuring the integrated density of the aSyn signal inside or outside of somatic compartments, manually delimited in the same field from MAP2 staining. Confocal imaging was performed on a Leica SP5 fitted with a 63X N.A. 1.4 objective.

Fibrils uptake analysis

Because fixation with PFA strongly diminished Fibrils fluorescence (Supp Fig 1), cells were imaged live with an epifluorescence microscope. Cells were treated with 20 or 100nM of Fibrils at DIV7, washed twice with culture medium 24 hours after treatment and immediately imaged. 5 fields were taken for each replicates. Fibrils associated fluorescence signal was measured in regions of interest (somata and a few µm of proximal neurites.), which were drawn from phase contrast acquisitions.

Western blot

Cells grown in 24-well plates were directly lysed and homogenized under reducing conditions in 4x Laemmli buffer (about 25 µL/well) on ice using a cell scraper, transferred to an Eppendorf tubes, heated to 95°C for 4 min and vigorously vortexed. After cooling to room temperature, samples were supplemented with solid urea up to a final concentration of ~5M, then frozen at -20°C until further use. Electrophoresis was performed on ultrathin (100µm) 12% polyacrylamide gels (Boxberg, 1988). After transfer onto nitrocellulose membrane (Protran 0.45µm, GE Healthcare), the lower molecular weight part of the Western blot (i.e. the region corresponding to aSyn bands) was additionally fixed in 4% PFA/0,05% glutaraldehyde in PBS for 30 min (adapted

from (Newman et al., 2013)). After extensive washing in PBS, the membrane was blocked with 5% fat-free milk powder in PBS (for aSyn detection), or 5% milk powder in TBS supplemented with 50mM NaF for pSyn detection, and incubated overnight with the different primary antibodies in the same solution. The C20R antibody (Santa Cruz) was used for detecting aSyn at 1/1000; for pSyn detection we used the D1R1R antibody from Cell Signaling Technology at 1/300, instead of the pSyn antibodies used for immunocytochemistry. The upper part of the Western blot was reacted with MMS-435P antibody against TUJ1 at 1/15000 (Biolegend). Alkaline phosphatase-coupled secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch (1/5000), and detection performed using nitro blue tetrazolium chloride/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate reagent (NBT/BCIP) in Tris-Mg⁺⁺ buffer at pH 9.5. After drying, Western blots were scanned, and relative protein amounts evaluated using the ImageStudio™ Lite application (Li-Cor Biosciences), with TUJ1 band intensities as internal reference for total neuronal protein content.

Statistical analysis

Statistical tests were performed with GraphPad Prism 5. Normality was first assessed through D'Agostino & Pearson omnibus normality test, and statistical significance was then assessed with a Mann Whitney test or an unpaired t-test with Welch's correction, according to distribution normality.

Results

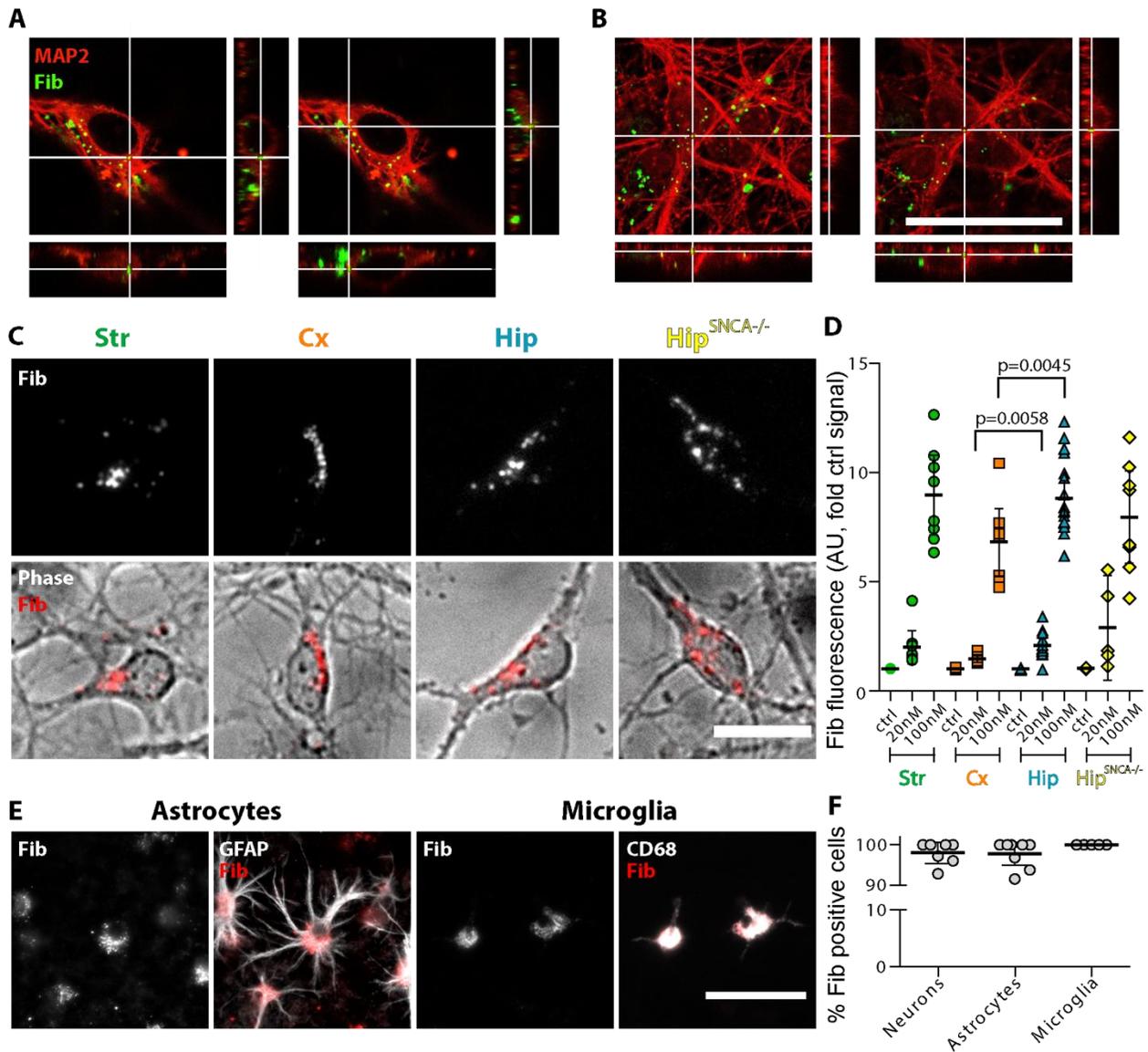


Figure 1 - aSyn Fibrils are similarly endocytosed in primary neuronal cultures from different brain regions

Primary neuronal cultures from WT or *SNCA*^{-/-} embryos were exposed to 100nM Fibrils at DIV7 and observed at DIV14. (A) Confocal imaging in fixed cells revealed that aSyn Fibrils were present in the neuronal lumen, as evidenced by localization of exogenously added aSyn Fibrils (green) in neuronal somas stained with TUJ1 (red) in Hip neurons and (B) in Cx neurons. Scale bar represents 50 μ m. (C) aSyn Fibrils are endocytosed by Str, Cx, Hip and Hip^{SNCA-/-} neurons, as evidenced by epifluorescence imaging. aSyn Fibrils fluorescence in red is superimposed to phase contrast images (gray). Scale bar represents 20 μ m. (D) Quantification of the mean aSyn Fibrils signal in neuronal somas in live cell cultures. 5 to 14 replicates from 2 to 3 individual experiments. Means \pm 95% confidence interval (CI95) are shown. Mann-Whitney test. (E) aSyn

Fibrils are taken up by astrocytes and microglia, as evidenced by epifluorescence imaging. Scale bar represents 100 μ m. (F) Quantification of the percentage of neuronal (MAP2 positive) or glial cells (GFAP and CD68 positive) containing aSyn Fibrils in fixed primary cultures. 5 to 8 replicates from 3 individual experiments. Means \pm 95% confidence interval (CI95) are shown.

aSyn Fibrils bind to and are taken up by neuronal populations with similar efficiencies

The first step of prion-like aSyn amplification is the uptake of extracellular seeds into the intracellular space. In order to assess quantitatively the uptake of aSyn Fibrils by different neuronal populations, we exposed striatal (Str), cortical (Cx) and hippocampal (Hip) primary neurons from wild type (WT) and *SNCA*^{-/-} (Hip^{*SNCA*^{-/-}}) mouse embryos to Atto550-labeled murine aSyn Fibrils (100nM, equivalent monomeric aSyn) for 24 hours. The amount of aSyn Fibrils that were taken up was next determined by live epi-fluorescent microscopy imaging and Fibrils intracellular localization was assessed by confocal microscopy (Fig 1A and 1B). Str, Cx, Hip from WT and *SNCA*^{-/-} mice were all found to efficiently take up aSyn Fibrils (Fig 1C). The fluorescence level of Str, Hip and Hip^{*SNCA*^{-/-}} neurons cell bodies exposed to 20 or 100nM of Fibrils were similar. More precisely, the fluorescence intensity increased 2 to 3 and 8 to 9 folds as compared to control unexposed neurons in cultures exposed to 20 or 100nM of Fibrils, respectively. A statistically significant lower increase in Cx neurons fluorescence (1.5- and 7-fold) was observed (Fig 1D).

A significant proportion of aSyn Fibrils was also located in neuronal processes and non-neuronal cells. Notably, Fibrils were also detected in astrocytes and microglia (Fig 1E), with respectively 97% and 100% of aSyn Fibrils positive cells (Fig 1F). Thus, Fibrils were efficiently taken up by neuronal and glial cells, and the extent of uptake was similar in neuronal populations derived from distinct brain regions with Cx neurons exhibiting a slightly less efficient uptake propensity. aSyn expression did not impact Fibrils endocytosis, as evidenced by similar uptake in WT and *SNCA*^{-/-} neurons.

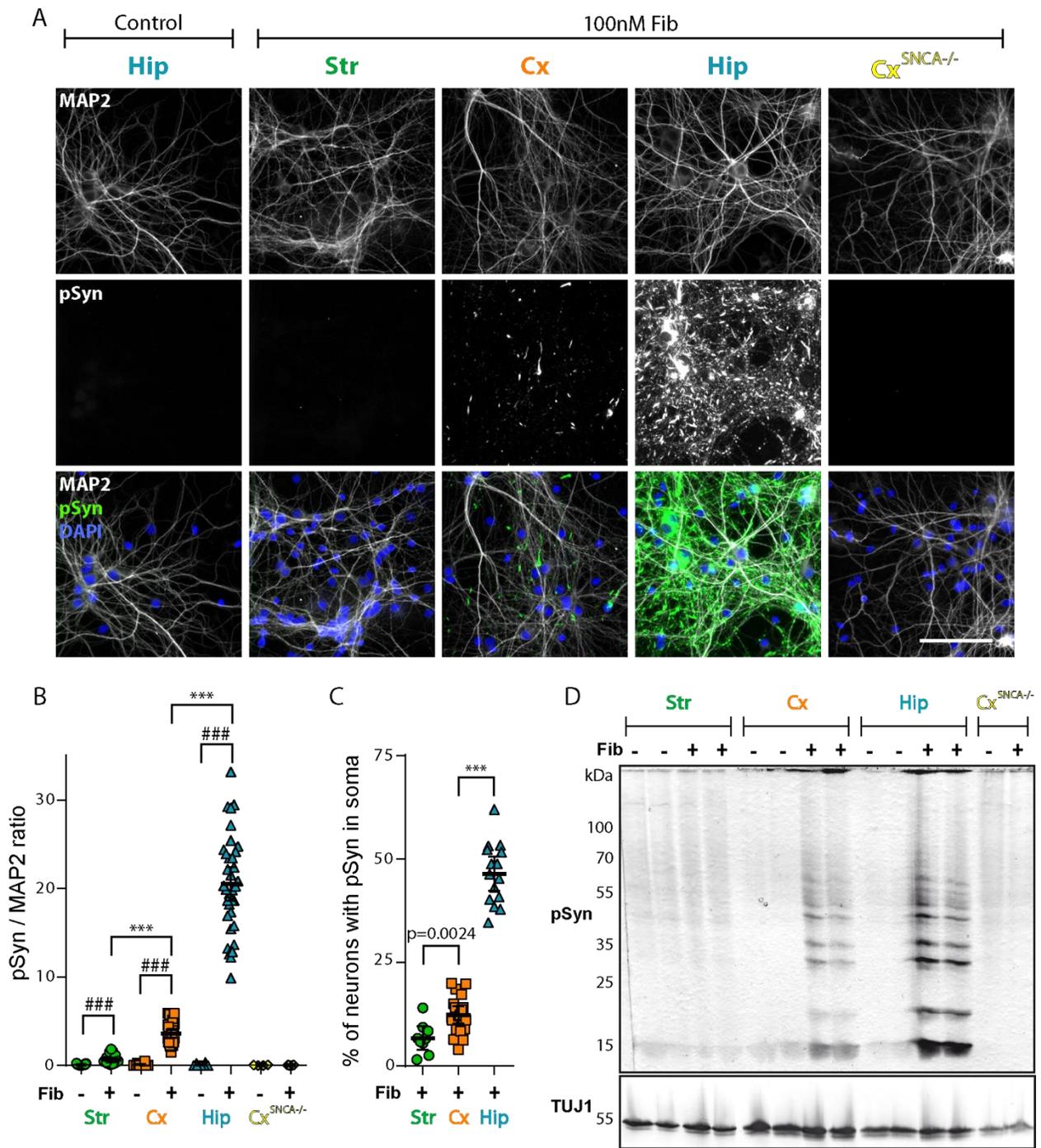


Figure 2 - aSyn fibrils seed endogenous aSyn to different extent in primary neuronal cultures from different regions

Primary neuronal cultures from different brain regions of WT or *SNCA*^{-/-} embryos were exposed to 100nM aSyn Fibrils or to vehicle at DIV7 and observed at DIV21. (A) Fixed cells were stained for MAP2 (gray), pSyn (green) and Hoechst (blue) and imaged by epifluorescence microscopy. Scale bar represents 100 μ m. (B) pSyn area / MAP2 area at fixed thresholds. 7 to 35 replicates

from 2 to 7 individual experiments. *, Unpaired t test with Welch's correction. #; Mann Whitney test. *** and #### indicate $p < 0.0001$. (C) Quantification of the percentage of neurons with somatic pSyn. 10 to 20 replicates from 3 to 5 individual experiments. Means \pm CI95 are shown. Unpaired t test with Welch's correction. (D) Primary neuronal cultures were exposed to 100nM aSyn Fibrils or to vehicle at DIV7, lysed at DIV14 and the amount of pSyn and TUJ1 quantified by Western blotting.

Differential pSyn accumulation in distinct neuronal populations

Exogenous aSyn fibrils have been shown to seed the aggregation of endogenous aSyn. The recruited aSyn is heavily phosphorylated (pSyn) (Fujiwara et al., 2002b). We thus quantified the amount of pSyn in Str, Cx and Hip neurons from WT and *SNCA*^{-/-} mice by immuno-staining with anti pSyn antibodies.

Primary Str, Cx and Hip neuronal cells from WT and *SNCA*^{-/-} mice were exposed to aSyn Fibrils (100nM, equivalent monomeric aSyn) for 7 days, then fixed, immuno-stained and imaged 7 days later. A linear concentration dependent accumulation of pSyn was observed upon exposure of exogenous aSyn fibrils to Hip neurons (Supp Fig 2). Interestingly, exogenous aSyn Fibrils and endogenous pSyn aggregates exhibited distinct patterns. Both in glial and neuronal cells, exogenous Fibrils were observed within subcellular compartments, mostly in somata and neurites in neurons, and appeared as puncta whose size (in the micrometer range) is incompatible with the size of individual fibrils (tens of nanometers) (Supp Fig 3). Seeded, aggregated pSyn, exhibited distinct morphological features, appearing as rods of several micrometers, localizing first in neurites before invading the perinuclear part of the somata (Supp Fig 4). Interestingly, the exogenous Fibrils and the endogenous pSyn assemblies only partially co-localize in agreement with our previous report showing that a fraction of internalized Fibrils escapes the endolysosomal compartment and gains access to the cytoplasm where they seed the aggregation of endogenous aSyn (Flavin et al., 2017). 14 days following exposure to exogenous Fibrils (100nM), all cells except cortical neurons from *SNCA*^{-/-} embryos (Cx^{*SNCA*^{-/-}}) exhibited intracellular pSyn staining (Fig 2A). This demonstrates that pSyn staining corresponds to aggregates made up of endogenous aSyn. Strikingly however, the amount of pSyn greatly differed between Str, Cx and Hip neurons. While Str neurons displayed rare and mostly small pSyn particles, Cx neurons contained numerous ones, which were both fibrillar and punctiform. Hip neurons exhibited the highest number of pSyn

particles. Some of these endogenous aggregates reached remarkable sizes (up to 50 μ m long) and spanned several neuritic branching points. We quantified the pSyn signal and normalized it by dividing it by the MAP2 signal (Fig 2B). This pSyn / MAP2 ratio was close to zero in all unexposed cells, and in Cx^{SNCA^{-/-}} neurons exposed to Fibrils. Str neurons exhibited a 5.8 times lower pSyn / MAP2 ratio than Cx neurons, which themselves had a 5.7 lower ratio than Hip neurons (Fig 2B). We then quantified the percentage of neurons positive for somatic pSyn assemblies (Fig 2C). 7% of Str, 11.2% of Cx and 47.3% of Hip neurons exhibited somatic pSyn, suggesting that a subpopulation of neurons was more sensitive to aSyn nucleation in each cell culture model.

Pure striatal cultures lead to neurons showing a partially differentiated phenotype compared to their counterparts grown in mixed primary cultures. To ascertain that the differential seeding within each neuronal culture is not due to partial differentiation of neurons in our primary cultures, we exposed Str neurons grown alone or in contact with Cx^{SNCA^{-/-}} axons to 100nM Fibrils as we demonstrated previously, using microfluidic culture chips, that fully mature Str neurons can be reliably obtained when grown in contact with Cx axon terminals (Lassus et al., 2018a). Str neurons in contact with Cx neurons showed an increased susceptibility to exogenous Fibrils seeding. Nonetheless, the amount of pSyn within innervated Str neurons was lower than that in Cx and Hip neurons (Supp Fig 4, Fig 2). Thus, low Str neurons vulnerability is not rescued by innervation-dependent maturation.

Western blot analysis of cells lysates 7 days following exposure to Fibrils yielded results coherent with pSyn immunofluorescence analysis (Fig 2D). Indeed, while Cx^{SNCA^{-/-}} neurons exposed to Fibrils exhibited no pSyn signal (Fig 2D, right lanes), we observed a very strong pSyn signal in Hip neurons at molecular weights corresponding to monomeric and multimeric aSyn. The pSyn signal in Cx neurons was lower than that observed for Hip neurons, and that for Str neurons indistinguishable from that of unexposed cells. Overall, our observations demonstrate that pSyn accumulation after exposure to Fibrils differs considerably between neuron of different origins in culture.

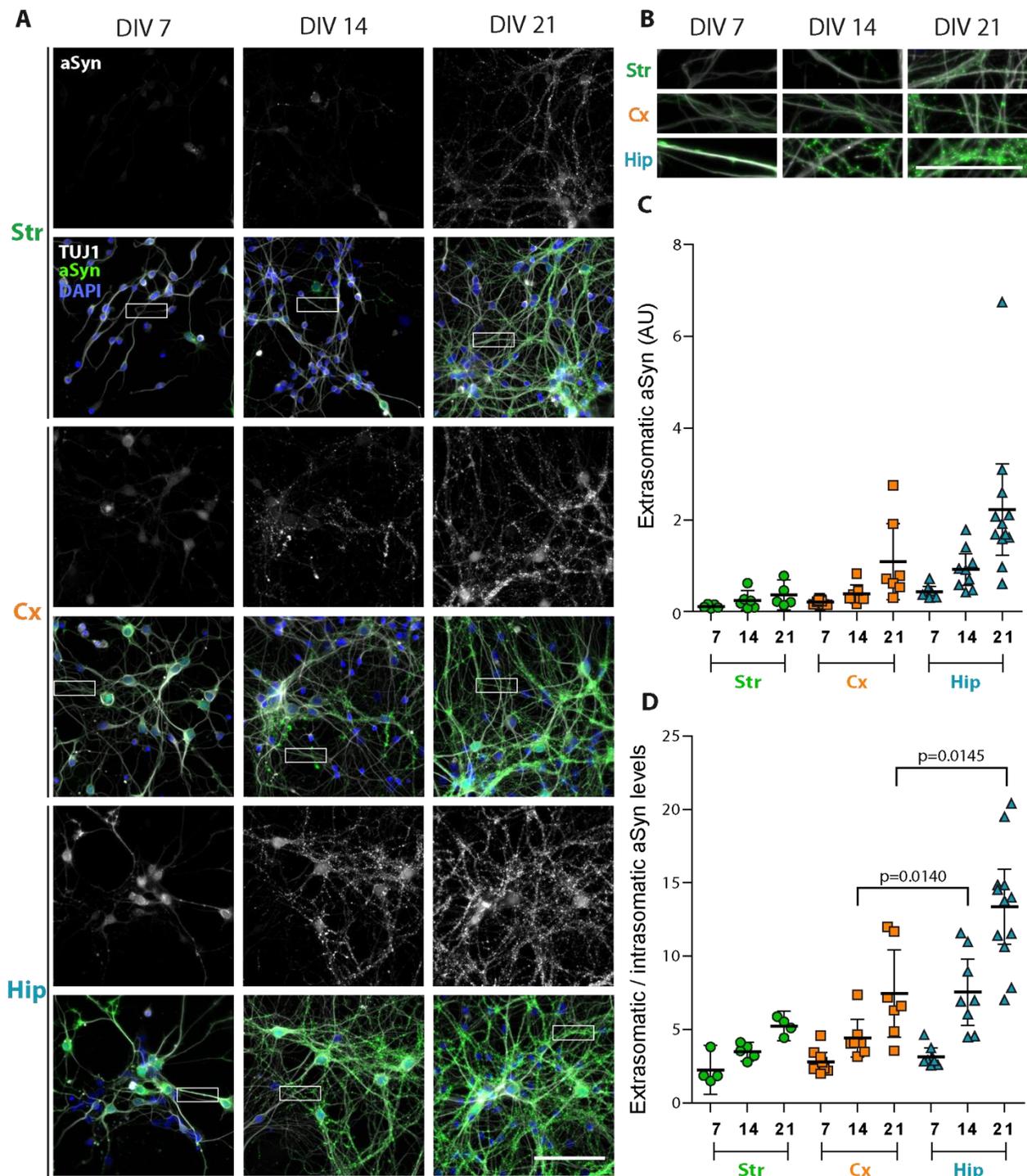


Figure 3 - Relationship between aSyn expression and synaptic enrichment and pSyn accumulation in primary neurons.

Primary neuronal cultures from different brain regions of WT embryos were fixed at DIV7, 14 or 21. (A) Cells were imaged with an epifluorescence microscope after staining for aSyn (green), TUJ1 (gray) and Hoechst (blue). Scale bar represents 100 μ m. (B) Zoom on neuritic segments of

images in A. Scale bar represents 50 μ m. (C) Quantification of the extra-somatic (synaptic) aSyn signal, normalized by the number of neuronal somas in the imaged field. 5 to 8 replicates from 2 to 3 individual experiments. Means +/- CI95 are shown. (D) Ratio of intra-somatic / extra-somatic (synaptic) aSyn. 4 to 12 individual replicates from 2 to 3 individual experiments. Means +/- CI95 are shown. Mann Whitney test.

Endogenous neuronal aSyn expression level matches exogenous Fibrils-mediated pSyn accumulation

A partial correlation between aSyn expression level in specific brain regions and their propensity to accumulate LP has been recently proposed (Erskine et al., 2018). Brain regions are composed of many different cell subtypes and SNCA has been reported to be differentially expressed amongst neuronal subpopulations (Emmanouilidou et al., 2016; Luna et al., 2018; Taguchi et al., 2018, 2016, 2014). We thus hypothesized that aSyn expression level in the primary neuronal cultures studied here could match their specific vulnerability to exogenous Fibrils-mediated seeding. Str, Cx and Hip neurons were cultured for 7, 14, or 21 days. After fixation, we stained them for aSyn, Hoechst and TUJ1 to assess aSyn expression level and subcellular localization (Fig 3A). The level of aSyn staining increased from 7 to 21 days of culture in all neuronal cultures. The intensity of aSyn staining differed between neurons, with a stronger signal in Hip compared to Cx neurons, and Cx compared to Str neurons. This difference was conserved over culture time. aSyn progressively acquired synaptic localization during neuronal development (Fig 3B). While intra-somatic aSyn staining modestly increased throughout culture maturation, synaptic aSyn consistently increased with time in all neuronal subtypes, although more drastically in Hip neurons (Fig 3C). Altogether, the ratio of synaptic to somatic aSyn increased with time, and was higher in Hip compared to Cx neurons, and higher in Cx compared to Str neurons (Fig 3D).

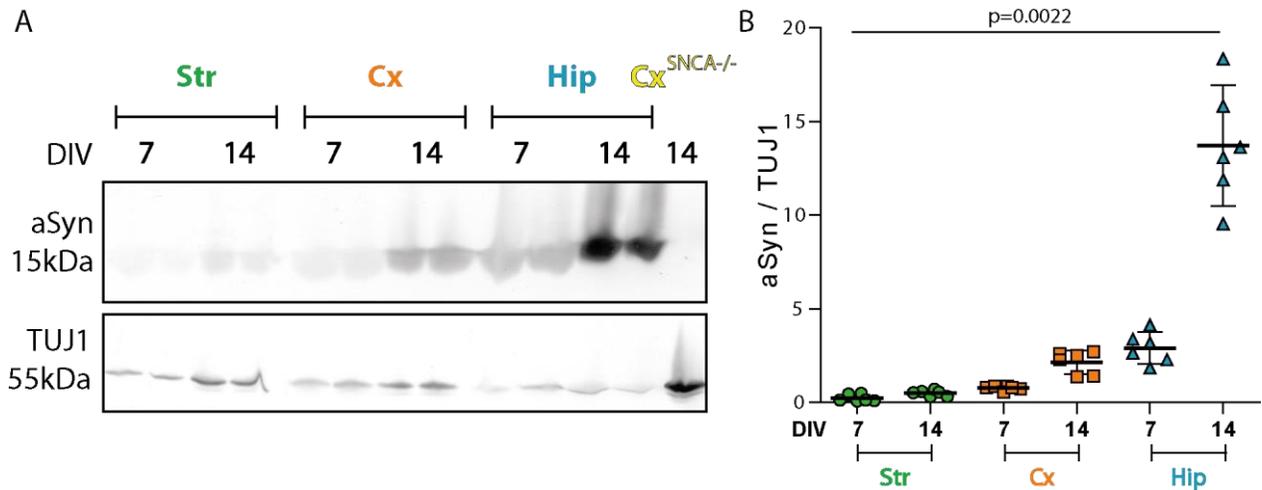


Figure 4 - Relationship between aSyn expression level and pSyn accumulation in primary neurons.

Primary neuronal cultures from WT or SNCA^{-/-} embryos were lysed at DIV7 or 14 and the amount of aSyn and TUJ1 quantified by Western blotting. (A) A representative WB is shown. (B) Quantification of aSyn signal normalized to TUJ1. Means +/- CI95 are shown. Mann Whitney test.

We next quantified aSyn expression in 7 and 14 days old neuron cultures by Western blot. No aSyn could be detected in Cx^{SNCA-/-} neuron lysates (Fig 4A). aSyn expression increased in all cell cultures between DIV7 and DIV14. The amount of aSyn was normalized to TUJ1. The amount of aSyn in 7 days old Hip neurons was 3.8 and 12.5 fold higher than in Cx and Str neurons of similar age, respectively. The figure was 4.3 and 27.5 fold higher in 14 days old Hip, Cx and Str neurons (Fig 4B). Taken together, the side-by-side assessments of pSyn accumulation (Fig 3) and aSyn expression (Fig 4) within Hip, Cx and Str neurons origins strongly suggest that exogenous Fibrils seeding efficiency in neurons tightly depends on aSyn expression levels.

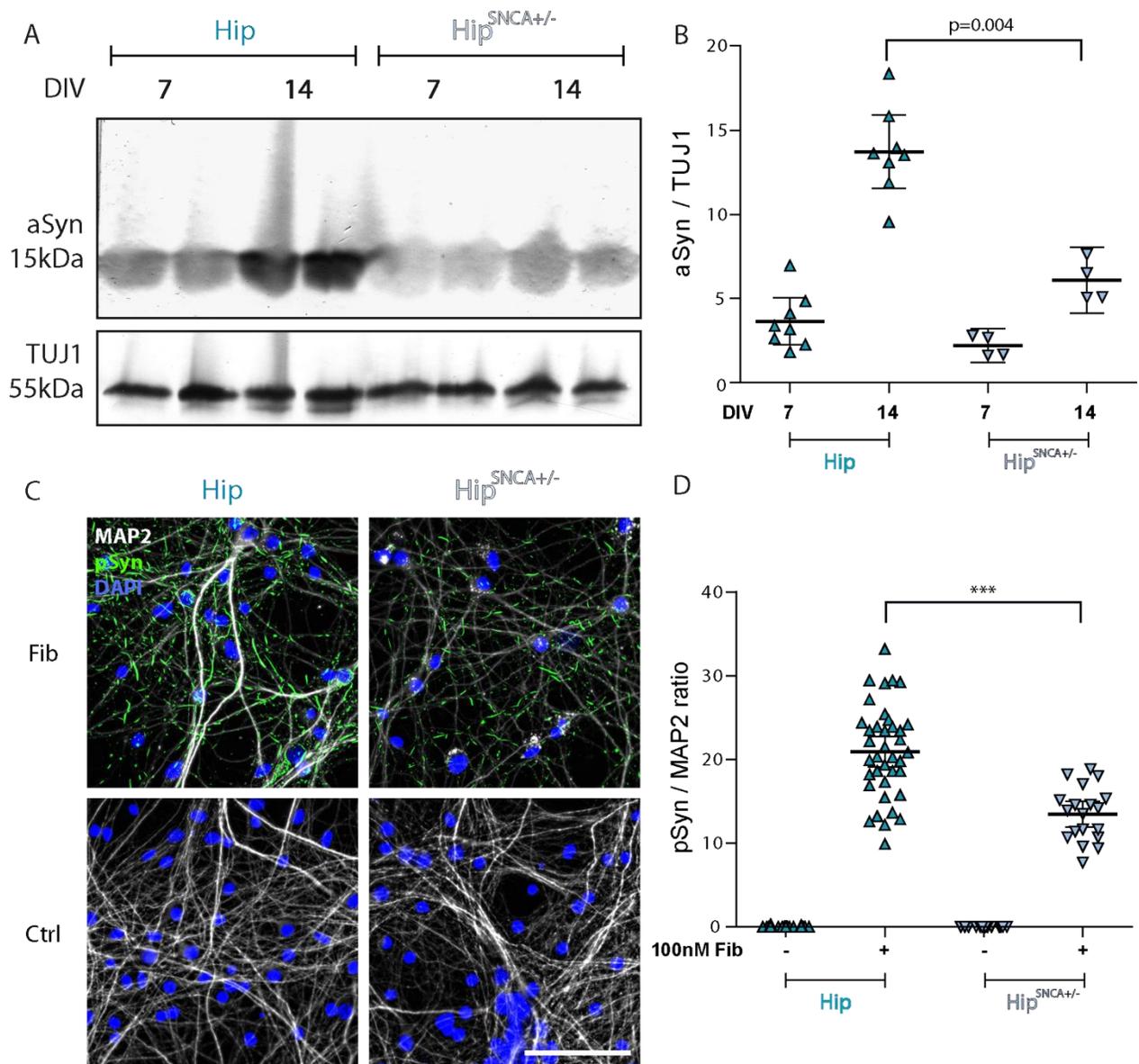


Figure 5 - Decreased aSyn Fibrils seeding propensity upon reduction of endogenous aSyn expression levels.

(A) Primary neuronal cultures from WT or SNCA^{+/-} embryos were lysed at DIV7 or 14 and the amount of aSyn and TUJ1 quantified by Western blotting. A representative WB is shown. (B) Quantification of aSyn signal normalized to TUJ1. Means +/- CI95 are shown. Mann-Whitney test. (C) Cells were exposed to 100nM aSyn Fibrils or vehicle at DIV7 and fixed at DIV21. Staining was performed for pSyn (green), MAP2 (gray) and Hoechst (blue). Scale bar represents 100µm. (D) pSyn area / MAP2 area at fixed thresholds. 14 to 38 replicates from 3 to 4 individual experiments. Means +/- CI95 are shown. Unpaired t test with Welch's correction.

aSyn expression level predicts pSyn deposition following exposure of neurons to exogenous aSyn Fibrils

Factors such as subcellular synuclein localization, neuronal proteostasis, neuronal physiology, might also impact exogenous Fibrils seeding propensity. To strengthen the link between aSyn expression levels and the extent of pSyn deposition following exposure of neurons to exogenous aSyn Fibrils, we selectively modulated aSyn expression levels by crossbreeding *SNCA*^{-/-} and WT mice and generating Hip primary neurons from *SNCA*^{+/-}. Assessment of aSyn expression levels normalized to TUJ1 expression in Hip *SNCA*^{+/-} neurons was 40 and 50% that in WT Hip neurons at DIV7 and DIV14, respectively (Fig 5A and 5B). WT and *SNCA*^{+/-} Hip neurons were next exposed to Fibrils and fixed as described previously. *SNCA*^{+/-} Hip neurons exhibited less and smaller sized pSyn particles as compared to WT neurons (Fig 5C). The pSyn / MAP2 ratio in Hip *SNCA*^{+/-} exposed to Fibrils was 30% lower than that in WT Hip neurons (Fig 5C and 5D). In addition, a relationship was observed upon plotting the average pSyn / MAP2 ratio after exposure to Fibrils for 14 days with the expression of aSyn in the 5 different neuronal cultures we used (Fig 6). Altogether, these results reinforce our conclusion that aSyn expression levels define the seeding propensity of exogenous Fibrils in different neuronal cell populations.

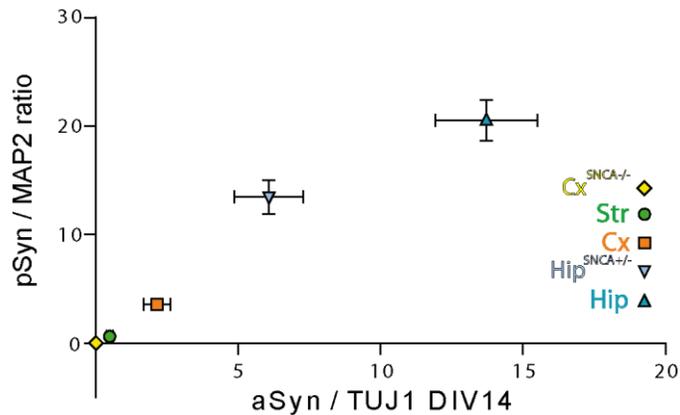
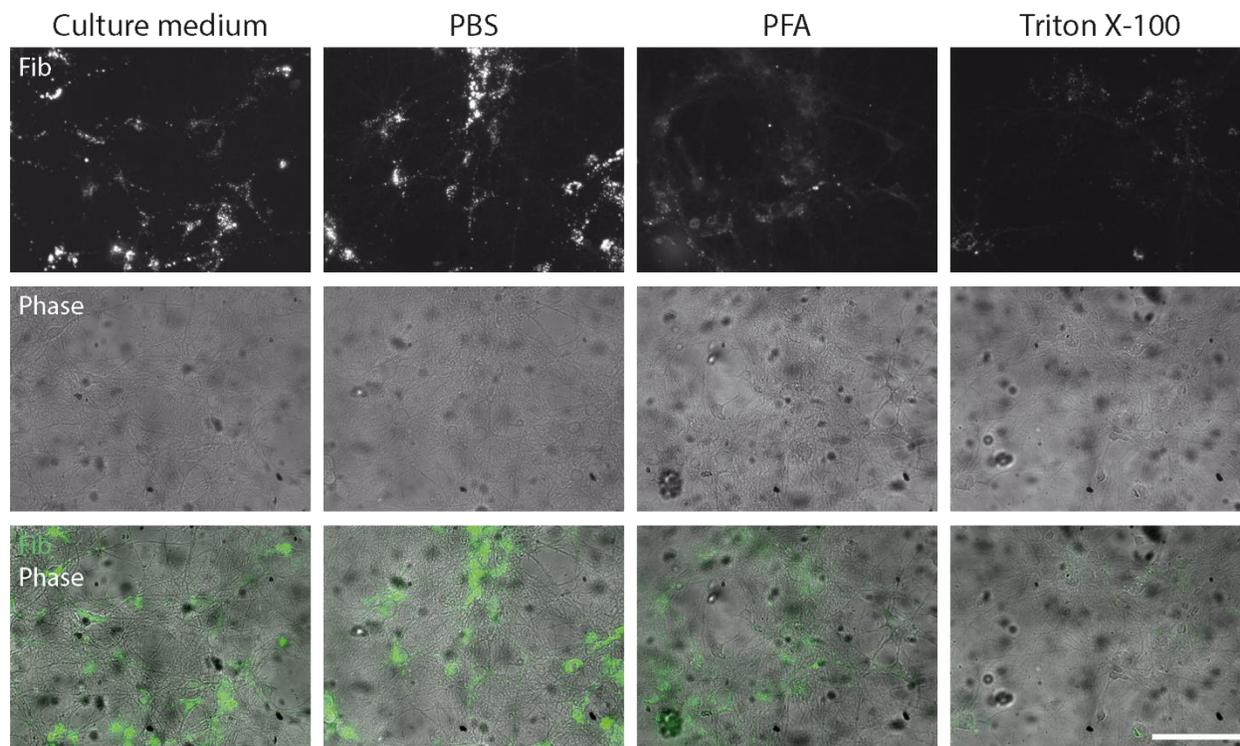


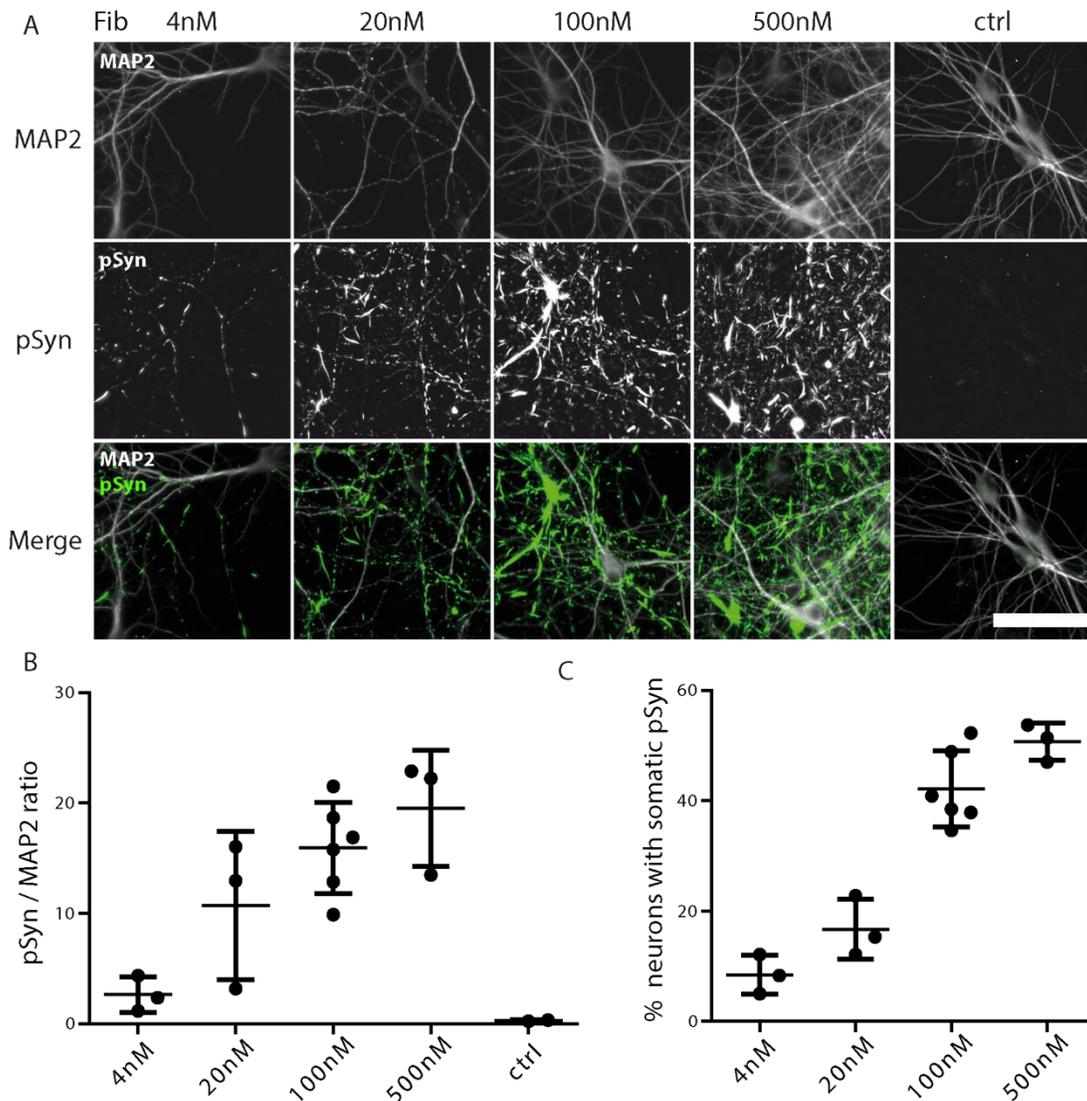
Figure 6 - Dose-response relationship between exogenous aSyn Fibrils-mediated aSyn seeding and endogenous aSyn expression levels.

The average aSyn expression level normalized to TUJ1 at DIV14 from Fig 5 and 6 was plotted in x with CI95 as error bars. The expression level of aSyn in CxSNCA^{-/-} is 0. The average pSyn / MAP2 ratios in primary neuronal cultures from different brain regions exposed to exogenous aSyn Fibrils (data from Fig 2 and 6) was plotted in y with CI95 as error bars.



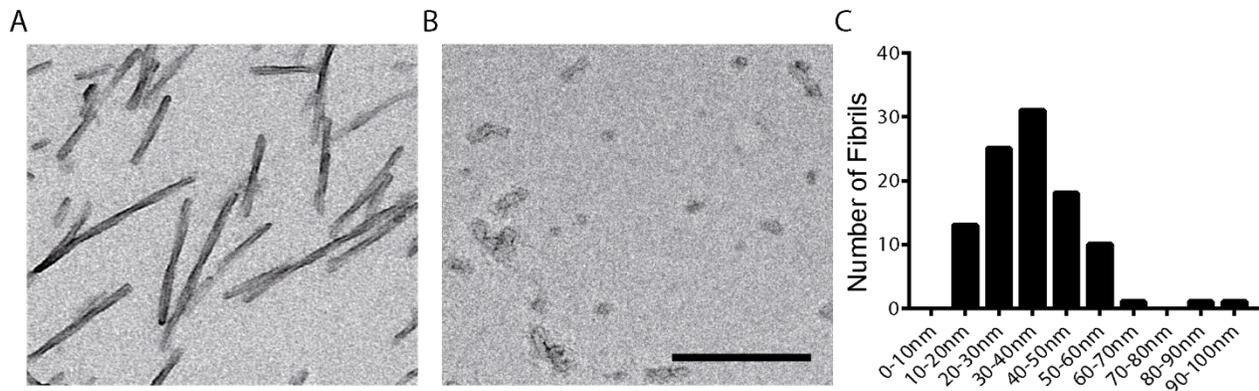
Supplementary Figure 1 - The fixation and permeabilization protocols decrease exogenous aSyn Fibrils fluorescence.

Primary hippocampal cultures were exposed to 100nM aSyn Fibrils at DIV7 and imaged 7 days later. Use of PBS versus culture medium did not notably modify signal to noise ratio of exogenous aSyn Fibrils fluorescence. 15min fixation with PFA notably decreased aSyn Fibrils fluorescence. 30min permeabilization with 0.2% Triton X-100 decreased signal even more and suppressed diffuse fluorescent signal that had appeared after PFA treatment. Scale bar represents 100µm.



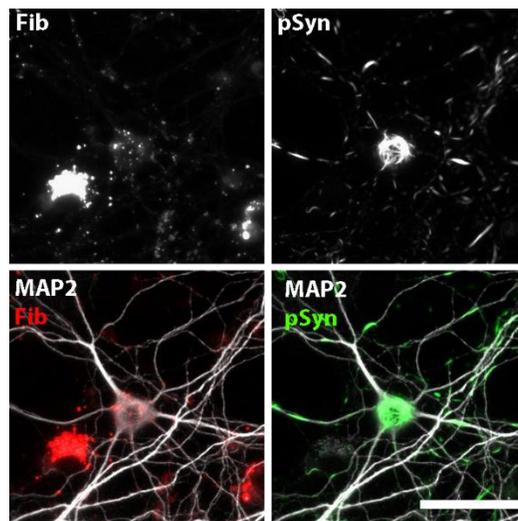
Supplementary Figure 2 - Relationship between exogenous aSyn fibrils amounts and endogenous aSyn seeding.

Primary hippocampal cultures were exposed to increasing concentrations of exogenous aSyn Fibrils at DIV7 and imaged 14 days later. (A) Representative fields. Cells were stained for MAP2 (gray) and pSyn (green). Scale bar represents 55 μ m. (B) pSyn area / MAP2 area ratio. n=3 to 5 individual replicates. Mean and CI95 are represented. (C) Percentage of neurons harboring somatic pSyn assemblies. n=3 to 5 individual replicates. Mean and CI95 are represented.



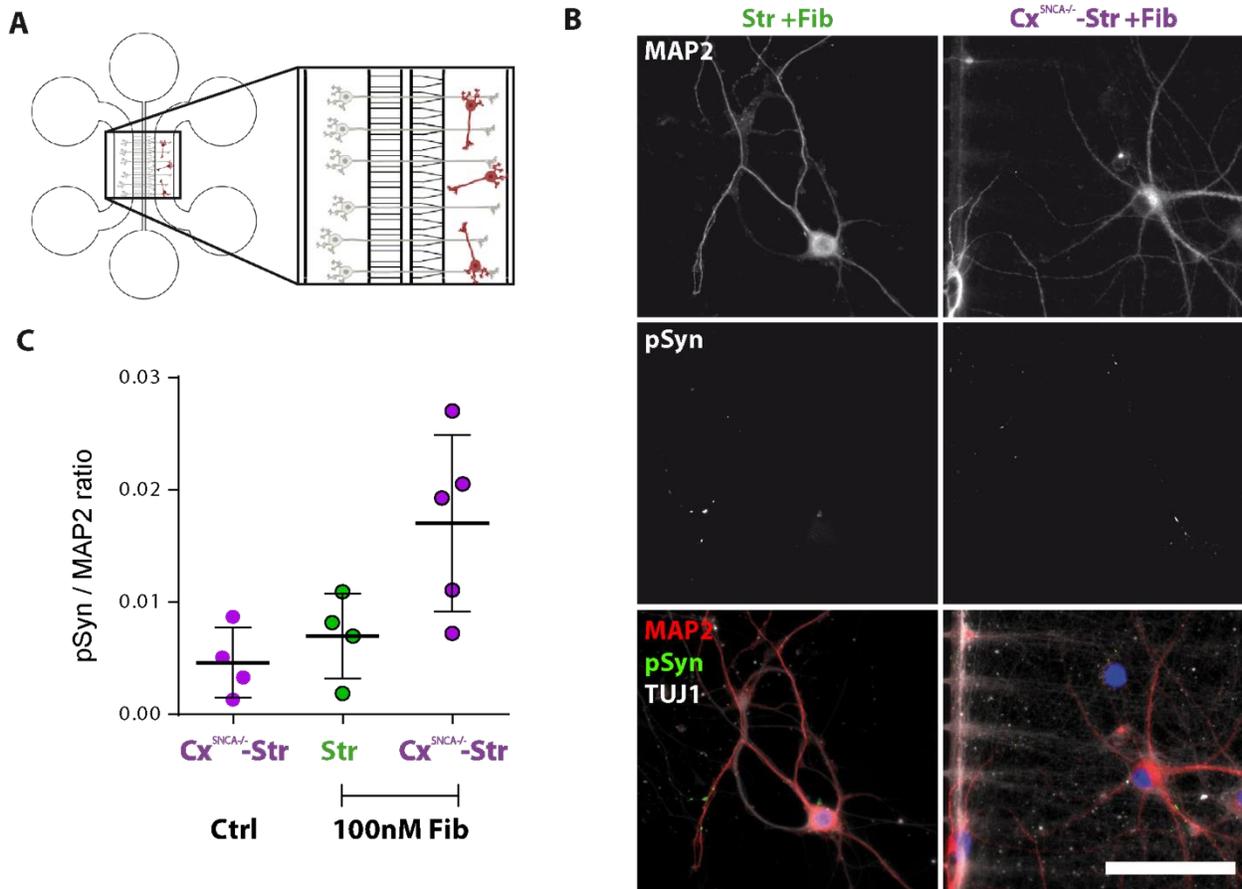
Supplementary Figure 3 - Characterization of the exogenous aSyn Fibrils used throughout this work.

Transmission electron micrographs of negatively-stained murine aSyn Fibrils (A) before and (B) after fragmentation. Scale bar represents 200nm. (C) Length distribution of the fragmented aSyn Fibrils. The number (n) of fibrils the histograms were derived from is indicated.



Supplementary Figure 4 - Co-localization of aSyn Fibrils and pSyn signals.

Primary hippocampal cultures were exposed to 100nM aSyn Fib at DIV7 and imaged 14 days later. MAP2 (gray) and pSyn (green) staining were performed. While aSyn Fibrils signal (red) was punctiform and mostly present in the soma of neurons and in non-neuronal cells, pSyn deposits were localized both in neuritic process and somas in the most extreme cases, forming perinuclear “cages”. Note the limited co-localization of pSyn and the most intense exogenous aSyn Fibrils signals. Scale bar represents 50µm.



Supplementary Figure 5 - Co-culture of Str with Cx^{SNCA}-/- axons does not strongly impact pSyn accumulation after exposure to aSyn Fibrils.

Co-culture of Str neurons with Cx^{SNCA}-/- axons was performed in a microfluidic co-culture chamber allowing for the preferential growth of axons from one side to another (here from the Cx^{SNCA}-/- chamber to the Str chamber). Exogenous aSyn Fibrils were introduced at DIV7 in the Str chamber, and were selectively excluded from the Cx^{SNCA}-/- chamber by maintaining a 100 μ l volume excess in the Cx^{SNCA}-/- chamber. (A) Schematics of the experimental setup. In gray are the Cx^{SNCA}-/- neurons and in red the Str neurons. (B) Representative fields of unconnected and connected Str neurons. Staining was performed for TUJ1 (gray), MAP2 (red), pSyn (green) and nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar represents 50 μ m. (C) pSyn area / MAP2 area ratio was computed. Means and CI95 are represented.

Discussion

The spread and amplification of protein aggregates is believed to contribute to the progression of several neurodegenerative diseases (Brundin et al., 2010; Goedert, 2015; Goedert et al., 2017a, 2017b; Guo and Lee, 2014; Jucker and Walker, 2018), in particular PD. The binding of aSyn assemblies to neuronal cells membrane is key in their prion-like propagation process. To this end, we identified aSyn assemblies neurons and astrocytes membranous interactome (Shrivastava et al., 2015). While the membranous interactome of aSyn assemblies, as demonstrated by their differential binding to different brain cells (Shrivastava et al., 2016), may define aSyn assemblies tropism for distinct neuronal cells, what defines their amplification remains elusive. Here, we show that despite a comparable uptake of exogenous aSyn Fibrils (Fig 1), the extent to which endogenous aSyn is seeded depends on primary neurons origin (Fig 2). Most important, we establish a relationship between aSyn expression levels and the seeding efficiency of exogenous aSyn Fibrils. This is achieved through a careful and quantitative assessment of aSyn expression level and the amplification of exogenous seeds in 5 different primary neuronal cultures from the Striatum, Cortex and Hippocampus of WT (SNCA +/+), knock out (SNCA -/-) and heterozygous (SNCA +/-) mice (Fig 2, 3, 4, 5 and 6). Altogether, our results demonstrate that aSyn expression levels define the seeding propensity of exogenous Fibrils in different neuronal cell populations.

Our findings are in good agreement with the literature on PD showing that changes in aSyn expression levels affects LP progression in patients. Indeed, duplications or triplications of the SNCA gene encoding aSyn were shown to be responsible for the early onset of familial forms of PD, with SNCA triplication inducing a more severe form of the disease than duplication. (Chartier-Harlin et al., 2004; Hardy et al., 2009; Ibáñez et al., 2004). Data obtained from pathological human brains suggested a relative good correlation of regional LP burden with aSyn expression with exception (Erskine et al., 2018). The imperfect agreement between LP burden and aSyn expression may be the consequence of the cellular heterogeneity, the complex topography of polarized neurons or preferential antero- or retro-grade active transport of aggregated aSyn and their local accumulation in the in vivo 3D environment. Indeed, as aSyn is mostly presynaptic, its local concentration could parallel that of afferents. In addition, aSyn aggregates appear in a centripetal fashion in neurons (Uchiyama, 2017), in agreement with our findings where pSyn deposits, despite

aSyn expression in the presynaptic terminals of mature neurons (Fig 4), accumulate in the somata of neurons exposed to exogenous Fibrils (Supp Fig 4).

It is worth noting that a relationship between aSyn expression levels and pSyn accumulation in different neuronal subtypes in the hippocampus has been proposed (Luna et al., 2018; Taguchi et al., 2014). aSyn expression levels definitely impact the seeding efficiency of exogenous Fibrils as it defines not only the rate at which exogenous endocytosed seeds grow by incorporating endogenous aSyn, but also the persistence of those aggregates despite the cellular machinery in charge of clearing them. Indeed, neurons expressing the highest levels of aSyn fuel better exogenous seeds, thus allowing their rapid growth that outweigh their clearance.

LP development in different regions of the mouse brain after fibrillar assemblies injection shows clear similarities with the differential accumulation of pSyn we report using primary neuronal cultures from the Str, Cx and Hip. Indeed, Luk and colleagues (Luk et al., 2012a) reported that injection of fibrillar assemblies in the striatum of WT mice resulted in moderate pSyn accumulation. The injection of the same fibrillar assemblies in the cortical or hippocampal regions resulted in severe pSyn pathology. Intriguingly, despite their highest ability to accumulate pSyn upon exposure to exogenous Fibrils, hippocampal neurons are not among the earliest to be affected by LP in PD patients. Indeed, the hippocampus is affected by LP pathology only at Braak stage 3 (Braak et al., 2004). We propose that the discrepancy between in vivo and in vitro data is the consequence of the progressive prion-like spread of aSyn aggregates from regions affected earlier by LP to Hip neurons. These regions might have other characteristics allowing de novo aggregation of aSyn, such as an intrinsic high oxidative stress, exposure to environmental stress, a higher expression of aSyn, etc. as reviewed by James Surmeier in 2017 (Surmeier et al., 2017). The experimental paradigm we designed appears perfectly suited to assess exogenous Fibrils seeding propensity dependence on aSyn expression within neurons from regions that are affected early on by pSyn deposits, such as dopaminergic neurons from the substantia nigra, provided they are amenable to be grown in sufficient amounts in vitro.

It is worth highlighting that exogenous Fibrils seeding propensity dependence on aSyn expression within neurons cannot be observed in transgenic models where aSyn expression is driven through

the use of a non-SNCA promoter, such as the Prion promoter (Emmanouilidou et al., 2016). Further precautions in the assessment of exogenous Fibrils seeding propensity dependence on aSyn expression should be taken when human aSyn (haSyn) is expressed in WT mice. Indeed, as co-expressing murine aSyn (maSyn) with haSyn decreases haSyn aggregation (Fares et al., 2016; Luk et al., 2016), the seeding propensity of haSyn fibrils will also be highly dependent on the level of maSyn in different mice brain regions.

Conclusions

By using primary neuronal cultures from various brain regions of mice expressing different level of aSyn, we demonstrated that neuronal populations exhibited strong difference in their ability to template aSyn aggregation after exposure to exogenous aSyn Fibrils. We demonstrate that exogenous aSyn Fibrils seeding propensity depends on neuronal aSyn expression. Our observations bring new insights into the mechanisms underlying specific vulnerability of brain regions and neuronal subtypes to LP thus providing a comprehensive framework for pSyn spatiotemporal spread pattern within the central nervous system.

Abbreviations

aSyn: alpha-synuclein

TUJ1: β -III-tubulin

Cx: cortex

Cx^{SNCA^{-/-}}: cortex from SNCA^{-/-} embryos

DLB: dementia with Lewy bodies

Hip: hippocampus

Hip^{SNCA^{-/-}}: cortex from SNCA^{-/-} embryos

SNCA: gene encoding aSyn

LP: Lewy pathology

MAP2: microtubule-associated protein 2

MSA: multiple system atrophy

PD: Parkinson's disease

PFA: paraformaldehyde

Fibrils: fluorescent pre-formed murine aSyn fibrils

pSyn: aSyn phosphorylated at Ser129

Str: Striatum

WB: western blot

WT: wild type

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (U.S. National Institutes of Health publication no. 85–24, revised 1985, and European Committee Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals) and the local, IBPS and UPMC, ethics committee approved the experiments (in agreement with the standard ethical guidelines of the CNRS “Formation à l’Expérimentation Animale” and were approved by the “C2EA -05 Comité d’éthique en experimentation animale Charles Darwin”).

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by grants from the European Commission: JC and JMP by MicroDEG (ERA-NET Neuron JTC2012 “Novel Methods”), JC and CV by HoliFAB (Horizon 2020 n°760927), LB and RM by IMPriND (Horizon 2020 n°116060), PD-MitoQUANT (Horizon 2020 n°821522) and the EC Joint Program on Neurodegenerative Diseases (TransPathND, ANR-17-JPCD-0002-02 and Protest-70, ANR-17-JPCD-0005-01). LB and RM were also supported by the Fondation Bettencourt Schueller, The Fondation pour la Recherche Médicale (Contract DEQ 20160334896) and the Fondation Simone et Cino Del Duca of the Institut de France. Microfluidic chips preparation was made possible with the support of Institut Pierre-Gilles de Gennes

(équipements d'excellence, "Investissements d'avenir", program ANR-10-EQPX-34). JC was supported by a fellowship from the French Ministry of Research.

Authors' contributions

JC generated the primary neuronal cultured, performed immunofluorescent staining, acquired epifluorescence and confocal images, analyzed the data, performed the statistical testing, generated the figures and wrote the first draft of the manuscript. LB generated, characterized and labeled exogenous aSyn fibrillar assemblies. YV generated the WBs and analyzed the gels. JC, LB, CV, RM and JMP participated in the conception of the experimental plan. JC, YV, CV, RM and JMP wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr. Christian Specht and Dr. Emmanuel Brouillet for their helpful comments in the conception of the experiments.

1. Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Haass C. Physiology and pathophysiology of alpha-synuclein. Cell culture and transgenic animal models based on a Parkinson's disease-associated protein. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;920:33-41.
2. Emanuele M, Chierigatti E. Mechanisms of alpha-synuclein action on neurotransmission: cell-autonomous and non-cell autonomous role. *Biomolecules.* 13 mai 2015;5(2):865-92.
3. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 28 août 1997;388(6645):839-40.
4. Goedert M, Spillantini MG. Lewy body diseases and multiple system atrophy as α -synucleinopathies. *Mol Psychiatry.* nov 1998;3(6):462-5.
5. Goedert M, Jakes R, Spillantini MG. The Synucleinopathies: Twenty Years On. *J Park Dis.* 2017;7(s1):S51-69.
6. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.* févr 2002;4(2):160-4.
7. Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM-Y, et al. Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem.* 13 déc 2002;277(50):49071-6.
8. Shahmoradian SH, Lewis AJ, Genoud C, Graff-Meyer A, Hench J, Moors T, et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of a crowded organellar, membranous medley. *bioRxiv.* 13 févr 2019;137976.
9. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* avr 2003;24(2):197-211.
10. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* oct 2004;318(1):121-34.
11. Li J-Y, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med.* mai 2008;14(5):501-3.
12. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med.* mai 2008;14(5):504-6.
13. Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VMY. Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. *J Exp Med.* 7 mai 2012;209(5):975-86.
14. Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, et al. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science.* 16 nov 2012;338(6109):949-53.
15. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, et al. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain J Neurol.* avr 2013;136(Pt 4):1128-38.
16. Mougnot A-L, Nicot S, Bencsik A, Morignat E, Verchère J, Lakhdar L, et al. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging.* sept 2012;33(9):2225-8.
17. Paumier KL, Luk KC, Manfredsson FP, Kanaan NM, Lipton JW, Collier TJ, et al. Intrastriatal injection of pre-formed mouse α -synuclein fibrils into rats triggers α -synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. *Neurobiol Dis.* oct 2015;82:185-99.
18. Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, et al. α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature.* 18 juin 2015;522(7556):340-4.
19. Recasens A, Dehay B, Bové J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Pérez-Villalba A, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol.* mars 2014;75(3):351-62.
20. Rey NL, Steiner JA, Maroof N, Luk KC, Madaj Z, Trojanowski JQ, et al. Widespread transneuronal propagation of α -synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *J Exp Med.* 22 2016;213(9):1759-78.
21. Rey NL, George S, Steiner JA, Madaj Z, Luk KC, Trojanowski JQ, et al. Spread of aggregates after olfactory bulb injection of α -synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. *Acta Neuropathol (Berl).* janv 2018;135(1):65-83.
22. Sacino AN, Brooks M, Thomas MA, McKinney AB, Lee S, Regenhardt RW, et al. Intramuscular injection of α -synuclein induces CNS α -synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci.* 22 juill 2014;111(29):10732-7.

23. Shimozawa A, Ono M, Takahara D, Tarutani A, Imura S, Masuda-Suzukake M, et al. Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain. *Acta Neuropathol Commun.* 2 févr 2017;5(1):12.
24. Brundin P, Melki R. Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 11 2017;37(41):9808-18.
25. Schapira AHV, Tolosa E. Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment. *Nat Rev Neurol.* juin 2010;6(6):309-17.
26. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2016;139 Suppl 1:318-24.
27. Holmes BB, DeVos SL, Kfoury N, Li M, Jacks R, Yanamandra K, et al. Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 août 2013;110(33):E3138-3147.
28. Ihse E, Yamakado H, van Wijk XM, Lawrence R, Esko JD, Masliah E. Cellular internalization of alpha-synuclein aggregates by cell surface heparan sulfate depends on aggregate conformation and cell type. *Sci Rep.* 21 août 2017;7(1):9008.
29. Lee H-J, Suk J-E, Bae E-J, Lee J-H, Paik SR, Lee S-J. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(9):1835-49.
30. Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam T-I, Yin X, Xiong Y, et al. Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science.* 30 2016;353(6307).
31. Shrivastava AN, Redeker V, Fritz N, Pieri L, Almeida LG, Spolidoro M, et al. α -synuclein assemblies sequester neuronal α 3-Na⁺/K⁺-ATPase and impair Na⁺ gradient. *EMBO J.* 1 oct 2015;34(19):2408-23.
32. Flavin WP, Bousset L, Green ZC, Chu Y, Skarpathiotis S, Chaney MJ, et al. Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins. *Acta Neuropathol (Berl).* oct 2017;134(4):629-53.
33. Freeman D, Cedillos R, Choyke S, Lukic Z, McGuire K, Marvin S, et al. Alpha-synuclein induces lysosomal rupture and cathepsin dependent reactive oxygen species following endocytosis. *PloS One.* 2013;8(4):e62143.
34. Jiang P, Gan M, Yen S-H, McLean PJ, Dickson DW. Impaired endo-lysosomal membrane integrity accelerates the seeding progression of α -synuclein aggregates. *Sci Rep.* 9 août 2017;7(1):7690.
35. Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, et al. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun.* 2013;4:2575.
36. Fares M-B, Maco B, Oueslati A, Rockenstein E, Ninkina N, Buchman VL, et al. Induction of de novo α -synuclein fibrillization in a neuronal model for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 févr 2016;113(7):E912-921.
37. Luk KC, Song C, O'Brien P, Stieber A, Branch JR, Brunden KR, et al. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 nov 2009;106(47):20051-6.
38. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, et al. Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron.* 6 oct 2011;72(1):57-71.
39. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Lee VM-Y. Addition of exogenous α -synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous α -synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat Protoc.* sept 2014;9(9):2135-46.
40. Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Louis JC, Citron M, Biere AL. alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 9 juill 1999;274(28):19509-12.
41. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJA, et al. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis.* juin 2011;42(3):360-7.
42. Brahic M, Bousset L, Bieri G, Melki R, Gitler AD. Axonal transport and secretion of fibrillar forms of α -synuclein, A β 42 peptide and HTTExon 1. *Acta Neuropathol (Berl).* avr 2016;131(4):539-48.
43. Fontaine SN, Zheng D, Sabbagh JJ, Martin MD, Chaput D, Darling A, et al. DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. *EMBO J.* 15 2016;35(14):1537-49.
44. Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, et al. Neuron-to-neuron transmission of α -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann Neurol.* oct 2012;72(4):517-24.
45. Gribaudo S, Tixador P, Bousset L, Fenyi A, Lino P, Melki R, et al. Propagation of α -Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network. *Stem Cell Rep.* 12 févr 2019;12(2):230-44.

46. Jang A, Lee H-J, Suk J-E, Jung J-W, Kim K-P, Lee S-J. Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *J Neurochem.* juin 2010;113(5):1263-74.
47. Rey NL, Petit GH, Bousset L, Melki R, Brundin P. Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathol (Berl).* oct 2013;126(4):555-73.
48. Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* 20 2017;18(2):101-13.
49. Lassus B, Naudé J, Faure P, Guedin D, Von Boxberg Y, Mannoury la Cour C, et al. Glutamatergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuits probed by dynamic calcium imaging of networks reconstructed in microfluidic chips. *Sci Rep [Internet].* déc 2018 [cité 23 avr 2019];8(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-35802-9>
50. Specht CG, Schoepfer R. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci.* 2001;2:11.
51. Ghee M, Melki R, Michot N, Mallet J. PA700, the regulatory complex of the 26S proteasome, interferes with alpha-synuclein assembly. *FEBS J.* août 2005;272(16):4023-33.
52. Fenyi A, Coens A, Bellande T, Melki R, Bousset L. Assessment of the efficacy of different procedures that remove and disassemble alpha-synuclein, tau and A-beta fibrils from laboratory material and surfaces. *Sci Rep.* 17 juill 2018;8(1):10788.
53. Boxberg YV. Protein analysis on two-dimensional polyacrylamide gels in the femtogram range: use of a new sulfur-labeling reagent. *Anal Biochem.* mars 1988;169(2):372-5.
54. Newman AJ, Selkoe D, Dettmer U. A new method for quantitative immunoblotting of endogenous α -synuclein. *PloS One.* 2013;8(11):e81314.
55. Erskine D, Patterson L, Alexandris A, Hanson PS, McKeith IG, Attems J, et al. Regional levels of physiological α -synuclein are directly associated with Lewy body pathology. *Acta Neuropathol (Berl).* janv 2018;135(1):153-4.
56. Emmanouilidou E, Minakaki G, Keramioti MV, Xylaki M, Balafas E, Chrysanthou-Piterou M, et al. GABA transmission via ATP-dependent K⁺ channels regulates α -synuclein secretion in mouse striatum. *Brain J Neurol.* mars 2016;139(Pt 3):871-90.
57. Luna E, Decker SC, Riddle DM, Caputo A, Zhang B, Cole T, et al. Differential α -synuclein expression contributes to selective vulnerability of hippocampal neuron subpopulations to fibril-induced toxicity. *Acta Neuropathol (Berl).* juin 2018;135(6):855-75.
58. Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tatebe H, Miyata S, Tokuda T, et al. Differential expression of alpha-synuclein in hippocampal neurons. *PloS One.* 2014;9(2):e89327.
59. Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J Comp Neurol.* 15 avr 2016;524(6):1236-58.
60. Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Expression of α -synuclein is regulated in a neuronal cell type-dependent manner. *Anat Sci Int.* 25 oct 2018;
61. Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* avr 2010;11(4):301-7.
62. Goedert M. NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science.* 7 août 2015;349(6248):1255555.
63. Goedert M, Eisenberg DS, Crowther RA. Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci.* 2017;40(1):189-210.
64. Guo JL, Lee VMY. Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med.* févr 2014;20(2):130-8.
65. Jucker M, Walker LC. Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci.* 2018;21(10):1341-9.
66. Shrivastava AN, Redeker V, Fritz N, Pieri L, Almeida LG, Spolidoro M, et al. Data in support of the identification of neuronal and astrocyte proteins interacting with extracellularly applied oligomeric and fibrillar α -synuclein assemblies by mass spectrometry. *Data Brief.* 12 févr 2016;7:221-8.
67. Chartier-Harlin M-C, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet Lond Engl.* 25 oct 2004;364(9440):1167-9.

68. Hardy J, Lewis P, Revesz T, Lees A, Paisan-Ruiz C. The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Curr Opin Genet Dev.* juin 2009;19(3):254-65.
69. Ibáñez P, Bonnet A-M, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet Lond Engl.* 25 oct 2004;364(9440):1169-71.
70. Uchiyama T. An order in Lewy body disorders: Retrograde degeneration in hyperbranching axons as a fundamental structural template accounting for focal/multifocal Lewy body disease. *Neuropathology.* 2017;37(2):129-49.
71. Luk KC, Covell DJ, Kehm VM, Zhang B, Song IY, Byrne MD, et al. Molecular and Biological Compatibility with Host Alpha-Synuclein Influences Fibril Pathogenicity. *Cell Rep.* 20 2016;16(12):3373-87.

Discussion

J'ai pu mettre en évidence que les 3 types de cultures provenant de différentes régions fixaient les agrégats exogènes avec une efficacité similaire, mais que la quantité d'inclusions se développant après exposition différait significativement. La fixation de l'aSyn exogène se fait indépendamment de l'expression de l'aSyn. Cependant, le niveau d'expression de l'aSyn contrôle la quantité d'inclusions se développant dans les cultures exposées aux agrégats exogènes, suivant un effet de dose-réponse. Ainsi, le niveau d'expression de l'aSyn semble être un facteur central contrôlant la quantité d'inclusions se développant dans des régions exposées à la même quantité d'agrégats seedants. Ces résultats suggèrent que la vulnérabilité intrinsèque de populations neuronales à l'agrégation peut fortement modifier le patron d'agrégation dans le SNC dans un scénario prion-like, et que le niveau d'expression de l'aSyn est un des facteurs centraux déterminants cette vulnérabilité intrinsèque.

Impact de la vulnérabilité intrinsèque à l'agrégation sur la propagation dans des réseaux de neurones : expériences avec des réseaux de neurones imparfaitement unidirectionnels

Ainsi, ces différentes populations neuronales diffèrent dans leur vulnérabilité intrinsèque à l'agrégation seedée de l'aSyn. J'ai cherché à générer des réseaux de neurones binaires à partir de ces différentes populations, et à évaluer comment se propage l'agrégation de l'aSyn dans ces différents systèmes. Cette partie de mes recherches a été de chercher à eu pour but de trancher entre deux visions de la propagation de l'agrégation dans les réseaux de neurones (Fig 27). La première vision suppose que la propagation de l'agrégation est strictement dépendante de l'expression de l'aSyn et de la génération d'agrégats dans chaque nouveau neurone « contaminé » par l'agrégation. Ce scénario, que j'ai dénommé « domino-like », impose que la présence d'un neurone non vulnérable entre deux neurones vulnérables empêche la propagation de l'agrégation de l'un à l'autre. Je propose un deuxième scénario, dans lequel la propagation de l'agrégation pourrait s'effectuer *via* un neurone indépendamment de la génération de nouveaux agrégats en son sein, c'est à dire indépendamment de sa vulnérabilité intrinsèque. Une telle propagation pourrait s'effectuer *via* l'internalisation d'agrégats par ce neurone, suivie de leur transport axonal et leur transmission à un neurone vulnérable. Dans ce cadre, les neurones faiblement vulnérables, bien qu'ils ne développent pas eux-mêmes d'inclusions détectables, peuvent servir de voies de transmission de l'agrégation dans les réseaux de neurones. Cette hypothèse repose sur les évidences expérimentales de la présence d'oligomères en quantité massive dans le cerveau des patients, dans des zones ne développant pas d'inclusions massives telles que les LBs (Roberts et al., 2015). Dans ce cadre, les facteurs de vulnérabilité intrinsèque des populations neuronales à l'agrégation de l'aSyn ne sont pas les mêmes que ceux déterminant le chemin de dissémination des petits oligomères.

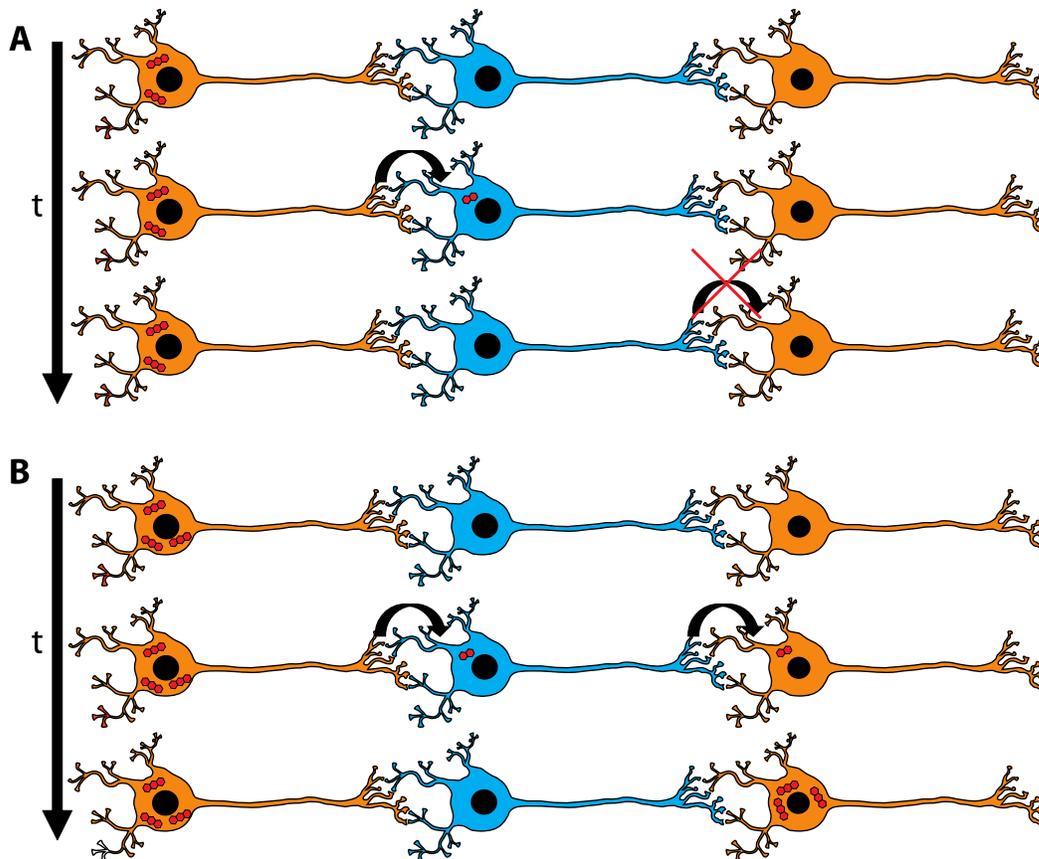


Figure 27 - Deux scénarios de propagation de l'agrégation dans les réseaux de neurones
 (A) Dans un scénario "domino-like", la présence d'un neurone non vulnérable à l'agrégation (en bleu) entre deux neurones vulnérables (en orange) empêchent la propagation des agrégats d'aSyn (en rouge). (B) Dans un scénario "en deux phases", les agrégats d'aSyn peuvent être transportés à travers le neurone non vulnérable, permettant la propagation de l'agrégation à travers celui-ci.

Afin d'éprouver la justesse de ces deux théories, j'ai reconstruit plusieurs types de réseaux binaires, en utilisant le système "diodes" précédemment développé dans mon laboratoire d'accueil. Ce système tire parti de la forme asymétrique des microcanaux reliant deux chambres de culture fluidiquement isolées. La forme en entonnoir de ceux-ci leur permet de récolter plus d'axones depuis l'une des chambres que de l'autre (Peyrin et al., 2011). La direction des connexions dans ce système est rehaussée par l'ensemencement de neurones à forte densité dans la chambre émettrice et à faible densité dans la chambre réceptrice. La reconstruction de trois types de réseaux : Cx -> Hip, Cx ^{SNCA}-/- -> Hip et Cx->Str (Striatum) devait me permettre d'étudier 1) l'impact de l'agrégation dans le compartiment présynaptique sur la propagation aux neurones postsynaptiques et 2) l'impact de la nature des synapses, cortico-hippocampales ou cortico-striatales, sur la propagation de

l'agrégation. Dans ce système, l'exposition du compartiment présynaptique à des mFib fluorescentes est suivie de leur détection, 24h plus tard, dans une fraction des neurones postsynaptiques. De façon frappante, le pourcentage de neurones positifs était sensiblement similaire dans les trois types de réseaux de neurones, suggérant que, comme le suppose l'hypothèse de propagation "en deux phases", la propagation d'agrégats exogènes se fasse indépendamment de la vulnérabilité intrinsèque du neurone émetteur (Fig 28). Ces résultats suggèrent également que la propagation se fasse indépendamment de la nature de la population postsynaptique. Cette dissémination des agrégats exogènes était suivie, dans une sous-partie des circuits reconstruits, de la détection de pSyn dans les neurones postsynaptiques, suggérant que l'agrégation se propage de neurone à neurone dans les réseaux de neurones *in vitro*. L'innervation massive du compartiment postsynaptique par des axones du compartiment présynaptique, et la faible quantité d'axones poussant en sens inverse nous a poussés à supposer que la propagation observée découlait d'un transfert interneuronal d'agrégat.

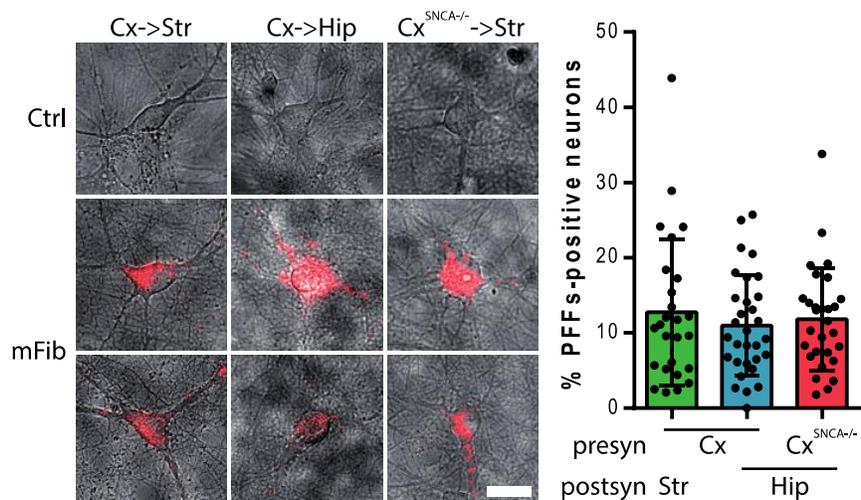


Figure 28 - Dissémination équivalente de fibres exogènes d'aSyn dans trois types de réseaux de neurones orientés à 95%

Trois réseaux de neurones ont été reconstruits *in vitro* avec les microcanaux décrits dans Peyrin et al 2011, et exposés dans le compartiment présynaptique à des agrégats exogènes d'aSyn fluorescents. La dissémination de ces agrégats aux neurones du compartiment postsynaptique a été évaluée en comptant manuellement le pourcentage de neurones positifs pour les agrégats exogènes. Gris:phase ; Rouge:Fibres exogènes. Barre d'échelle : 20um.

Cependant, certains résultats expérimentaux suggèrent que la propagation au compartiment postsynaptique provenait en partie des axones poussant en sens rétrograde. Tout d'abord, en cherchant à visualiser les agrégats endogènes se développant dans le compartiment postsynaptique, j'ai reconstruits des réseaux dont le composant présynaptique n'exprimait pas l'aSyn, afin de mettre en évidence la présence d'agrégats d'aSyn spécifiquement dans les neurones postsynaptiques et non dans les axones provenant du compartiment présynaptique. Or cette expérience mit en évidence qu'une grande partie des neurones positifs envoyaient un axone dans le compartiment présynaptique (Fig 29). Ces résultats suggèrent qu'une partie non négligeable des neurones positifs pour pSyn avaient en réalité internalisés les agrégats exogènes directement *via* leur axone, et non suite à un transfert interneuronal.

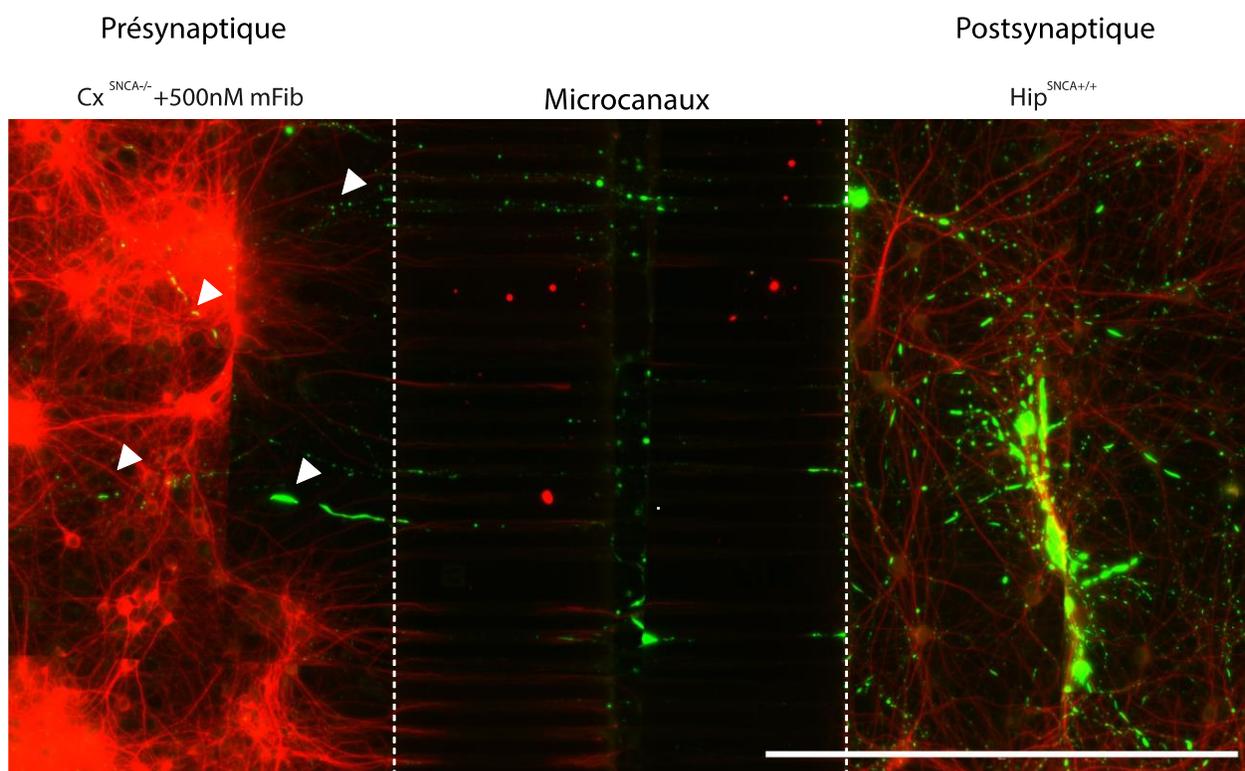


Figure 29 - Propagation de l'agrégation aux neurones postsynaptiques *via* les axones poussant en sens "rétrograde"

Un réseau reconstruit dans le système "diodes" avec en présynaptique des neurones corticaux n'exprimant pas l'aSyn et en postsynaptique des neurones hippocampaux WT a été exposé à DIV7 à 500nM de mFib dans le compartiment présynaptique, et a été fixé 14 jours après exposition.

Des neurones pSyn+ sont présents dans le compartiment postsynaptique, mais de nombreux axones pSyn+ sont également détectables dans le compartiment présynaptique. Barre d'échelle : 500um.

Un contrôle visant à vérifier l'isolation fluide et le transport interneuronal des agrégats vint renforcer l'hypothèse d'une forte dissémination *via* les connexions rétrogrades. Cette expérience contrôle consiste à ne pas ensemercer de neurones dans le compartiment présynaptique, mais seulement dans le compartiment postsynaptique, et à introduire des agrégats dans le compartiment présynaptique. Dans ce cadre, toute propagation des agrégats aux neurones postsynaptique n'est pas due à un transfert interneuronal, mais soit à une diffusion passive des agrégats à travers les microcanaux, ou à un transfert *via* les quelques axones poussant en sens « rétrograde », du compartiment postsynaptique vers le compartiment présynaptique (Fig 30A). L'analyse de cette expérience révéla alors que la dissémination des agrégats exogènes s'effectuait en l'absence de neurones dans le compartiment présynaptique (Fig 30B). Ces résultats suggèrent que la propagation rétrograde au corps cellulaire suivant l'exposition directe d'axones à des agrégats est notablement plus efficace que le transfert interneuronal antérograde de ceux-ci.

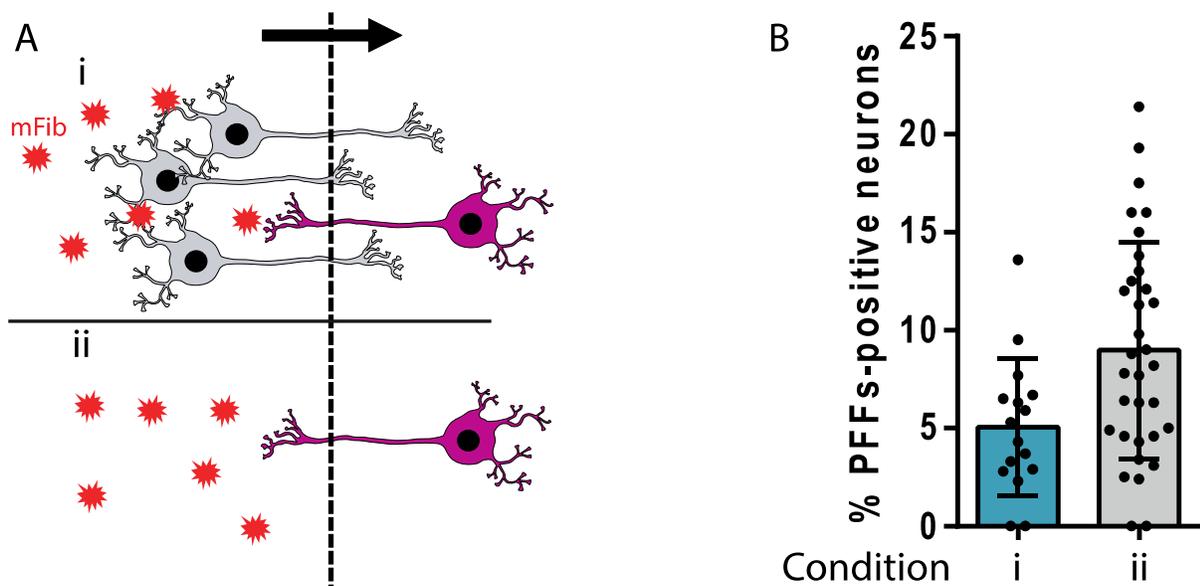


Figure 30 - Mise en évidence d'une forte propagation *via* les connexions rétrogrades dans le système "diodes"

(A) Schéma du protocole expérimental. (i) Dans le système "diodes", de rares connexions poussent en sens inverse de celui imposé par les microcanaux (flèche), depuis les neurones postsynaptiques (violet) vers le compartiment où sont introduits les neurones présynaptiques (gris). Des fibres exogènes (mFib, rouge) sont introduites dans le compartiment présynaptique. (ii) Même schéma expérimental, sans neurones dans le compartiment présynaptique. (B) Résultat de la quantification de la propagation aux neurones postsynaptiques, 1j après exposition d'un réseau DIV14 à 500nM de mFib dans le compartiment présynaptique, selon la condition expérimentale présentée en (A).

Article 2 - Développement d'un nouveau système de reconstruction de réseaux de neurones orientés - Publié dans "Methods in Cell Biology" en 2018

Introduction

Ces derniers résultats ont motivé le développement d'un nouveau système de reconstruction de réseaux de neurones, permettant de reconstruire des réseaux de neurones unidirectionnels. Parmi les stratégies proposées dans la littérature pour filtrer la pousse axonale dans une seule direction, nous avons décidé d'améliorer le système "arches" précédemment publié par l'un de mes laboratoires d'accueil (Renault et al., 2016). Cet article a également pour but de populariser la reconstruction de réseaux de neurones *in vitro* en exposant un protocole détaillé et des aides au design et à l'utilisation de systèmes de cultures similaires.

Reconstruction of directed neuronal networks in a microfluidic device with asymmetric microchannels

Josquin Courte^{*,†,1}, Renaud Renault[‡], Audric Jan^{*,§}, Jean-Louis Viovy^{*},
Jean-Michel Peyrin[†], Catherine Villard^{*,1}

^{*}Physico-Chimie Curie, Université PSL, CNRS, Institut Pierre-Gilles de Gennes
pour la Microfluidique, Paris, France

[†]Sorbonne Université, Institut Biologie Paris-Seine, CNRS, Inserm,
Neuroscience Paris-Saïne, Paris, France

[‡]Koniku, Berkeley, CA, United States

[§]CNRS, Inserm, Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, Paris, France

¹Corresponding authors: e-mail address: josquin.courte@curie.fr; catherine.villard@curie.fr

CHAPTER OUTLINE

1	Introduction	2
2	Method	4
2.1	Overview.....	4
2.2	Protocol.....	6
2.2.1	Material.....	6
2.2.2	Fabrication of the PDMS Chip.....	7
2.3	Imaging: Acquisition and Display.....	15
2.4	Automated Image Analysis.....	15
3	Results	16
4	Discussion	21
	Acknowledgment	24
	References	24

Abstract

Microfluidic devices for controlling neuronal connectivity *in vitro* are extremely useful tools for deciphering pathological and physiological processes occurring in neuronal networks. These devices allow the connection between different neuronal populations located into

Methods in Cell Biology, ISSN 0091-479X, <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.07.002>
© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1

separate culture chambers through axon-selective microchannels. In order to implement specific features of brain connectivity such as directionality, it is necessary to control axonal growth orientation in these devices. Among the various strategies proposed to achieve this goal, one of the most promising and easily reproducible is the use of asymmetric microchannels. We present here a general protocol and several guidelines for the design, production and testing of a new paradigm of asymmetric microchannels geometries based on a "return to sender" strategy. In this method, axons are either allowed to travel between the emitting and receiving chambers within straight microchannels (forward direction), or are rerouted toward their initial location through curved microchannels (reverse direction). We introduce variations of these "arches" microchannels and evaluate their respective axonal filtering capacities. Importantly, one of these variants presents an almost complete filtration of axonal growth in the non-permissive direction while allowing robust axonal invasion in the other one, with a selectivity ratio as high as 99.7%.

1 INTRODUCTION

Understanding normal and pathological brain function is an arduous task considering the intrinsic complexity of this organ. Neuronal processes are the result of the collective action of cells connected in a finely tuned, complex and dynamic 3D pattern. Physiological and pathological mechanisms thus have to be addressed in a network context. Gaining access to the connectome of *in vivo* neurons is very challenging, due to the abundance of both short- and long-range connections and to the multilayered architecture of the brain. Current experimental models used to study neurodegenerative diseases range from whole animal models that preserve the anatomical structures but greatly limit the experimentation at the cellular level to dissociated cell culture systems that allow detailed manipulation of cell phenotype but lack the highly ordered and instructive environment of the brain. These models are poorly adapted to efficiently and reliably study the detailed molecular/cellular phenomena at play. Thus, it is of prime interest to be able to reconstruct neuronal networks of controlled topologies *in vitro* and to manipulate each network node independently.

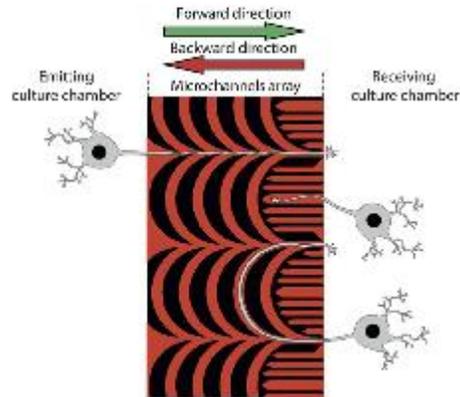
The development of tools for controlling neuronal connectivity *in vitro* has been the subject of much interest during the last decades. While seminal observations showed that distinct neuronal populations can form connections *in vitro* (Chubakov & Somnikov, 1982), exerting a fine control on this process has proven difficult. Based on the observation that neurons in culture requires specific adhesive molecules to attach and grow on a surface, microcontact printing and local protein/chemical deposition have been among the first strategies allowing to constrain neuronal outgrowth on flat substrates (Corey, Wheeler, & Brewer, 1991; Wyart et al., 2002). Microfluidic techniques were later picked up as the next generation methods for controlling neuronal microenvironment. They mostly follow up on the seminal work of Campenot, who devised a method for fluidically isolating neurites from somas of cultured neurons with millimetric teflon inserts (Campenot, 1977). This technique was made more reproducible and accessible by Taylor and colleagues, thanks to the use of PDMS (polydimethylsiloxane) for

fabricating chambers and rectangular microchannels (Taylor et al., 2005). It allows very efficient axon/soma compartmentalization of a great variety of neuronal subtypes and their fluidic isolation. In addition, neuronal populations introduced on both sides of these microchannels connect one to each other by generating a bidirectional network (Taylor, Dieterich, Ito, Kim, & Schuman, 2010). However, directional connectivity being a fundamental feature of brain networks (Kale, Zalesky, & Gollo, 2018), the possibility to orient axonal growth would increase the physiological relevance of these models. The first proof of concept that neuronal populations could be connected in a directional manner came from studies aiming at controlling axonal outgrowth through physical constraints using asymmetrical microchannels to guide axons (Peyrin et al., 2011). The use of asymmetric microchannels shapes has then been further extended (Gladkov et al., 2017; Le Feber, Postma, De Weerd, Weusthof, & Rutten, 2015), and some of these designs allowed good performances regarding axonal filtration, reaching a selectivity ratio as high as 10 between the forward and reverse directions.

However, whereas these proofs of concept and their related performances have revealed useful for studying basic neurophysiological functions such as neurotransmission (Peyrin et al., 2011), diode-like electrical response (Renault et al., 2015) or pathological mechanisms (Deleglise et al., 2013, 2014; Virlogeux et al., 2018), the presence of some unwanted “retrograde” neuronal connections, even in very low proportion, can be problematic. This is particularly true for studying the trans-neuronal propagation of pathogenic, self-amplifying agents such as viruses and prion-like protein aggregates, particularly to evaluate the role of anterograde (from soma to the pre-synaptic compartment) versus retrograde (from post-synaptic compartment to soma) propagation (Volpicelli-Daley, Luk, & Lee, 2014). Thus, it is of prime importance to dispose of a complete microfluidic toolbox including devices allowing 100% of axonal selectivity in mature networks.

We described in 2016 a new efficient paradigm for mechanical axonal filtration based on a “return to sender” strategy (Renault, Durand, Viovy, & Villard, 2016). Our approach relies on two axonal pathfinding properties: (i) the tendency of axons to follow the corners defined by two perpendicular adhesive surfaces (here the edges of microchannels), and (ii) their finite flexural rigidity, defining a critical axonal bending angle. By using an array of straight and curved microchannels, we generate guiding edges or cusps depending on the axonal growth direction. Axons encountering cusps will ignore them and continue their path along the straight channel toward the opposite chamber. On the contrary, axons facing the convex side of curved microchannels will follow the curved edges and will be progressively guided back to their destination of origin. See Fig. 1 for an illustration of the principle of axonal filtration using arches.

Here, we describe in detail how to fabricate and handle microfluidic devices taking advantage of this paradigm for reconstructing oriented neuronal networks *in vitro*. In addition, we show variants of this design and evaluate their filtration power on axons originating from primary cultures of murine cortical and hippocampal neurons. Notably, one of these designs reaches 99.7% (cortical neuron)

**FIG. 1**

Principle of axonal filtration by arches microchannels. Two culture chambers (blank spaces on left and right) are linked by an array of microchannels (in red). Axonal growth from the "emitting" culture chamber to the "receiving" culture chamber ("Forward direction") is unimpeded, with processes following a slightly undulating path. In contrast, axonal growth in the reverse direction ("Backward direction") is prevented by two strategies: (1) the implementation of "dead-end traps" to prevent or delay axonal growth inside the microchannels, and (2) the "return to sender" filtration supported by curved "arches" microchannels.

and 100% (hippocampal neurons) selectivity after 11 days of culture. Importantly, this orientation was preserved in a network context, where both chambers were seeded with neurons.

Different types of neuronal cultures may require specific geometric guiding clues. In order to allow members of the scientific community to develop new microchannels tailored to their needs, we present here a general protocol for microfluidic chips production from design to cell culture and guidelines for adequate microchannels design, and share a semi-automatized tool for quantifying axonal filtration. We also share the files encoding the culture chambers and directional microchannels, as well as the script allowing for semi-automated analysis of axonal transmission.

2 METHOD

2.1 OVERVIEW

This protocol covers every step from conception of microchannels shapes to cell seeding, with the exception of photomask fabrication, often subcontracted to specialized companies. The design of the photomask encoding microchannels and cell

seeding chambers is made with a computer-assisted design (CAD) software. The resulting file (.dxf, .gerber, etc.) is used for photomask production. Fabrication of the initial mold is performed by photolithography. This mold can be used for the production of PDMS replicas, but is very brittle and can be damaged after several cycles of molding/demolding. To avoid too frequent time-consuming photolithography-assisted microfabrication, a sturdier resin mold can be generated from one or several PDMS replicas. Once demolded from the resin master, PDMS blocks containing the culture chambers and microchannels are bonded to glass coverslips using an oxygen or air plasma treatment. The resulting chips are sterilized, coated with adhesion molecules, and cells can be seeded in the desired compartments. The use of primary neuronal cultures expressing a fluorescent protein facilitates the dynamical observation of axonal growth without any staining protocol. After a few days of incubation, axonal growth can be assessed by fluorescence microscopy. Semi-automatic image processing allows the quantification of axonal outgrowth in both directions. In the following, the term "axonal chamber" will refer to the chamber opposite to the seeding chamber.

All devices described in this work contain two 1 mm wide culture chambers at both extremities of the microchannels, and a central chamber crossing this array (Fig. 2).

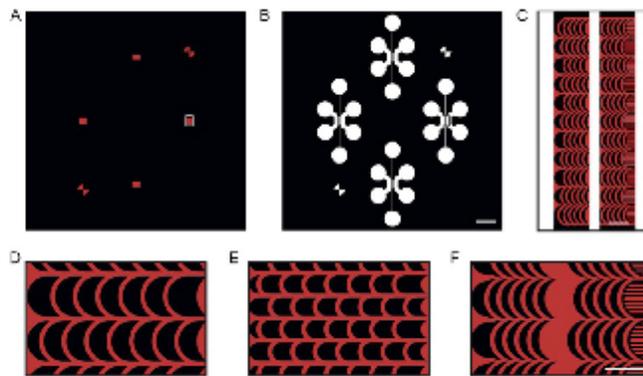


FIG. 2

Microchannels and culture chambers designs. (A) Culture chambers with central chamber (white) are designed with circles at both ends for easy wells punching. Four sets of chambers are designed for producing a chip containing four networks. Alignment crosses are present on both extremities of the design. (B) Microchannels (red) are designed with the same alignment crosses than the macrochambers. Scale bar for A and B is 5 mm. (C) Zoom on the circled parts of A and B when both masks are combined: "sawtooth" arches microchannels (red) aligned with culture and central chambers (white). Scale bar is 100 μm . (D) 100 μm diameter, 6/7 repeats arches microchannels. (E) 40 μm diameter, 6/7 repeats arches microchannels. (F) "Sawtooth," 9 repeats arches microchannels with a space managed for not burying arches under central chamber. Scale bar for (D)–(F) is 100 μm .

6 Microchannels for directed axonal growth

The central chamber has several functions: (1) to apply a counterflow during cell seeding, whatever one chamber or both are seeded. (2) to perform axotomy by briefly flowing a detergent solution in this chamber, as was performed in Deleglise et al. (2013). Moreover, this chamber allows for an efficient fluidic isolation of the culture chambers and thus the individual application of a separate treatment to each of them when this compartment is overpressurized (Fig. 3; see also Taylor et al., 2005). Lastly, "trap" patterns were designed to reduce the number of axons entering the microchannels in the reverse direction (see Fig. 1).

2.2 PROTOCOL

2.2.1 Material

2.2.1.1 Reagents and consumables

- Polydimethylsiloxane (base + curing agent) (PDMS, Ellsworth Adhesives)
- Glass coverslips, 5 cm diameter, 130–160 μm thickness (Fisher Scientific)
- Disposable 250 mL plastic cups (Dutscher)
- Square 10 cm wide plastic dish (Thermo Fisher Scientific)
- 6 cm petri dishes (Dutscher)

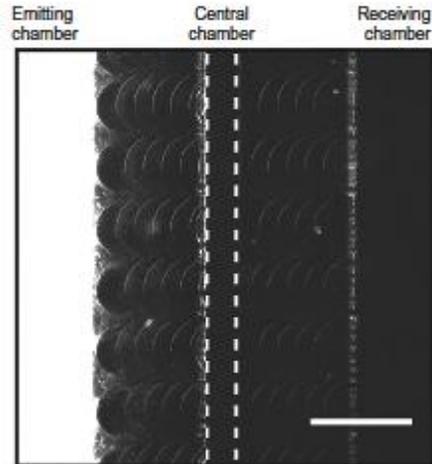


FIG. 3

Fluidical isolation in the device. A solution of Alexa-Fluor 488 coupled antibodies introduced in the emitting culture chamber does not flow to the receiving culture chamber during at least 24 h if a 100 μL volume excess is maintained in the central chamber. Dotted lines define the central chamber. Scale bar is 100 μm .

- Poly-D-lysine hydrobromide 30–70kDa (PDL) (Sigma)
- Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (Sigma)
- SU8 negative photoresists 2002 and 2050 (MicroChem)
- SU8 photoresist developer: propylene glycol monomethyl ether acetate (PGMEA) (Technic)
- Soda lime chromium photomask with microchannels design (Selba)
- Plastic flexible photomask with culture chambers design (Selba)
- Isopropanol (VWR)
- Polyglass epoxy resin+reticulation agent (Esprit Composite)
- Primary murine neurons expressing fluorescent protein (Td Tomato)
- Cell culture medium
 - 91% DMEM, High glucose, Glutamax supplement, pyruvate (Thermo Fisher Scientific)
 - 5% Fetal Bovine Serum (GE Healthcare)
 - 2% B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific)
 - 1% N-2 supplement (Thermo Fisher Scientific)
 - 1% Penicillin/Streptomycin 10,000U/mL (Thermo Fisher Scientific)
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) (Sigma)
- Dust-free wipes (Dutscher)

2.2.1.2 Equipment

- Clean room containing:
 - MJB4 mask aligner (SUSS MicroTec)
 - Spin-coater
 - Hotplates (65, 95 and 200°C) (Stuart)
 - Rotary shaker
 - Fume hood
 - Nitrogen spray gun
- Weighing scale
- 70°C oven (Mettler)
- Vacuum pump linked to desiccator (Ideal Vacuum)
- Oven dedicated to epoxy resin baking, placed under a fume hood (Mettler)
- Cell culture hood
- Plasma cleaner Pico PCCE (Diener electronic)
- UV sterilization cabinet
- Epifluorescence microscope (DMI8 from Leica, sCMOS Hamamatsu LT Flash 4.0 camera)
- Cell culture incubator (37°C, 5% CO₂, humidified atmosphere) (Panasonic)

2.2.2 Fabrication of the PDMS chip

2.2.2.1 Rules for chips design

Two photomasks have to be drawn, respectively, for microchannels and culture chambers, using for example open-source softwares (QCAD, Clewin, LibreCAD, etc.). Large culture chambers (Fig. 2A) can be fabricated from plastic photomasks

while microchannels (Fig. 2B) typically require the micron-scale precision associated to "hard" chromium masks.

Several constraints resulting from the physical properties of the used materials (photoresist, PDMS) or from the rules governing axonal navigation might impact the proper fabrication and functioning of your device. These are to be kept in mind when designing your photomask and planning the height of the different structures.

- It is necessary to align properly microchannels with seeding chambers during photolithography. Draw at least a pair of complementary alignment crosses on the two photomasks encoding microchannels and chambers. Placing them on both extremities of your masks allows a good angle-wise alignment. Making them big enough (2mm or bigger) for preliminary alignment with naked eyes will speed up the alignment step (Fig. 2A and B).
- To ensure that microchannels will open on both chambers, an efficient method is to draw them longer than needed, so that their ends will be buried into the second (higher) layer of photoresist coding for the seeding chambers.
- Before drawing your photomasks, take note of the dimensions of the mask aligner holder. This will allow you to estimate the usable area of your mask.
- Long-term axonal health might be impacted by narrow microchannels ($< 2\mu\text{m}$).
- The roof of your PDMS microchannels might collapse and stick to the bottom of the chip during post-plasma bonding. To avoid this, do not plan aspect ratios of > 1 to 4 for channels (e.g., $3\mu\text{m}$ high, $12\mu\text{m}$ wide). If needed, add regularly interspaced micropillars for roof support ($12\mu\text{m}$ distant $2\mu\text{m}$ diameter pillars for $3\mu\text{m}$ high microchannels).
- To avoid the penetration of cell bodies into microchannels during cell seeding, microchannels should have a height comprised between 2 and $3\mu\text{m}$. Inducing a counterflow from the chamber opposite to the cell seeding chamber by filling it with medium before seeding the cells prevents the smallest of them to pass through. Cell migration (especially of glial cells) might still occur during culture time, albeit rarely.
- Avoid microchannels of excessive length that might impair axonal survival while delaying the formation of synaptic connections. Typical growth of axons through straight $500\mu\text{m}$ long microchannels occurs from DIV (day *in vitro*) 2 to DIV 4.
- Synchrony of neuronal activity between two neuronal populations requires a critical threshold of functional synaptic interconnectivity to be reached. Thus a minimal innervation degree, experimental conditions-dependent, has to be obtained. Having microchannels too far apart might prevent activity synchrony between the two populations.
- The outer walls of the channels located at both ends of the microchannels array are a potential source of defect for axonal selectivity by being able to guide axons in both directions. When designing a chip, one has to pay attention of coding several looped channels at the level of these outer walls to account for the absence of arches.

- Very long (centimetric) macrochambers might generate heterogeneities in cell culture medium composition: areas next to the reservoirs will be preferentially perfused compared to the central ones, inducing gradients of nutriment with a risk of cell death in the center. Consequently, the length of the macrochambers (i.e., the distance between inlets) should be limited to millimetric dimensions.

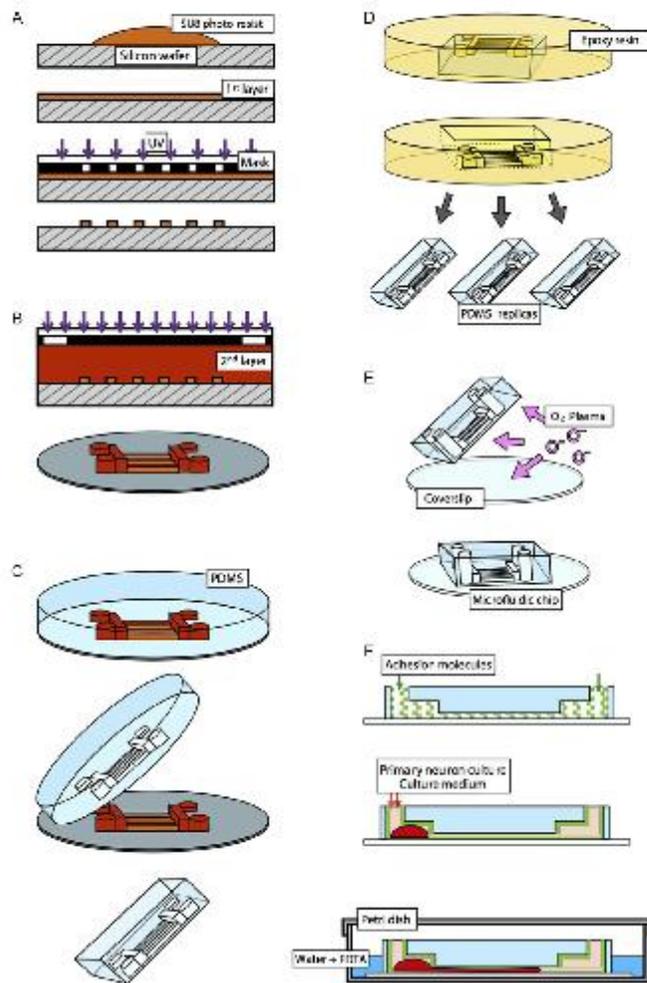
2.2.2.2 Master fabrication

This protocol describes how to produce 3 μm high microchannels linking 50 μm high culture chambers on a 4 in. silicon wafer.

All of the following steps should be performed in a dust-free atmosphere. Use flat tweezers to manipulate silicon wafers.

2.2.2.2.1 First layer (see Fig. 4A)

1. Sprinkle a silicon wafer with isopropanol above an empty 80mm diameter crystallizing dish ("trash") for about 5 s. Place the wafer on an absorbent paper and dry it with pressurized nitrogen using an air blow gun.
2. Place the wafer on a hotplate for at least 3 min at 200 °C to dry the surface, then transfer it on the bench to let it cool down to room temperature.
3. Place the wafer on a spin-coater. Check that the spin-coater is working properly by verifying that the aspiration of the wafer is effective (the wafer should spin and stay in place during the nominal rotation speed).
4. Gently pour a volume of SU8-2002 photoresist that covers about 70% of the wafer surface with a pipette. Eliminate eventual bubbles by aspirating them with the same pipette.
5. Spin-coat the photoresist on the wafer in two steps:
 - a. 500 rpm for 10 s with acceleration of 100 rpm/s
 - b. 700 rpm for 30 s with acceleration of 300 rpm/s
6. Soft bake: place the coated wafer on a first hotplate regulated at 65 °C for 30s then on a second one regulated at 95 °C for 2 min. Then transfer the wafer on the bench and let it cool down at room temperature.
7. Place the chromium mask onto the mask holder of the aligner, chrome side up, and turn on the vacuum to secure it. Flip the holder with the mask sucked onto it, chrome side down, and insert it into the aligner.
8. Place the coated wafer on the chuck of the mask aligner and set the distance between the mask and the wafer at 0 μm ("Hard contact" mode).
9. Expose the first layer to UV light through the chromium mask. With a 3 μm layer of SU8 photoresist, exposure dose should be about 90 mJ/cm^2 . The exposure time is calculated by dividing the exposure energy E specific for each photoresist by the effective power of the UV lamp, modulated by the absorption of the mask: $P_{\text{eff}} = P_{\text{lamp}} (1 - \text{Absorption}_{\text{mask}})$. Absorption is about 0.2 (20%) for plastic masks and negligible for chromium mask.
10. Remove the wafer from the aligner and soft bake as in step 6. Let it cool down at room temperature.

**FIG. 4**

Microfluidic chips fabrication protocol. (A) Microchannels photolithography: spin-coating of photoresist, insulation and development. (B) Culture chambers photolithography and fabrication of the master. (C) PDMS reticulation on master and fabrication of a PDMS replica. (D) Resin mold preparation from replica and chips preparation from the mold. (E) Bonding of PDMS replica and glass coverslip. (F) Preparation of the microfluidic chip for culture, seeding of neurons and culture conditions.

11. Immerse the wafer for 1 min in 50 mL of developer contained into a 10 cm diameter beaker shaken at 90 rpm on a rotary shaker.
12. Remove the wafer from the developer bath and place it above the “trash” dish. Briefly sprinkle the wafer for a few seconds with developer, then with isopropanol.
13. Place the wafer on an absorbent paper and dry it with pressurized nitrogen using an air blow gun.
14. Hard bake: place the wafer on a hotplate regulated at 200 °C for about 5–10 min to eliminate surface cracks.
15. Check the quality of the structures under an optical microscope.
16. Check the height of the microchannels with a profilometer.

2.2.2.2 Second layer (see Fig. 4B)

1. Cut thin stripes of adhesive tape. Cover the alignment crosses on the first photoresist layer with these stripes. Be careful not to overlay the surface where chambers will be imprinted. A part of these stripes should protrude on the sides of the wafer for easy removal.
2. Place the wafer on a spin-coater. Check that the spin-coater is working properly by verifying that the aspiration of the substrate is effective (the substrate should spin and stay in place during the nominal rotation speed).
3. Pour a volume of SU8-2050 to cover about 4 cm in diameter of the wafer on its center. Do it directly from the container, due to the high viscosity of SU8-2050.
4. Spin-coat the wafer with the resin in two steps:
 - a. 500 rpm for 10 s with acceleration of 100 rpm/s.
 - b. 3000 rpm for 30 s with acceleration of 300 rpm/s.
5. Gently remove the adhesive tape.
6. Soft bake: place the coated wafer on a hotplate regulated at 65 °C for 2 min, then on a second one regulated at 95 °C for 7 min. Place the wafer on the bench and let it cool down at room temperature.
7. Place a transparent glass plate on the mask holder of the mask aligner and turn on the vacuum to secure it. Insert the holder into the mask aligner slide channels. The plastic mask encoding the geometry of the culture chambers will be glued later by capillarity to this transparent support.
8. Place the plastic mask on the silicon wafer, ink side facing the photoresist, and roughly align the alignment crosses by hand.
9. Place the silicon wafer and plastic mask on the chuck of the mask aligner.
10. Put a small drop of distilled water (around 50 μ L) on top of the plastic mask and slide the chuck in working position. Do not deposit too much water, or it will spill through the sides of the plastic mask and perturb the alignment step.
11. Lift up the chuck until achieving hard contact. The plastic mask will stick by capillarity to the glass plate, while remaining roughly aligned with the silicon wafer.

12 Microchannels for directed axonal growth

12. Activate the separation lever of the mask aligner. This allows a slight lowering of the wafer and consequently hard contact suppression for easy alignment.
13. Move the chuck with the micrometric screws of the aligner to superpose the alignment marks of the two layers: first by adjusting the angle between them, then by changing *x/y* position. The mask should not move during this operation.
14. Put the separation lever back to its initial position (i.e., come back to hard contact).
15. Expose the second layer through the mask. Exposure dose should be $170\text{mJ}/\text{cm}^2$. For calculating the exposure time, take into account the absorbance of the plastic: around 20% at 385 nm.
16. Remove the wafer from the aligner and soft bake as in step 6. Ensure that the wafer has cooled down at room temperature by waiting 1–2 min at the end of this step.
17. Repeat steps 11–13 of Section 2.2.2.1 using now a soaking time in the developer of 6 min.
18. Check the quality of the structures under an optical microscope.
19. Check their height with a profilometer.

2.2.2.3 Mold production (see Fig. 4C and D)

SU8 resin molds are not suitable for mass production of chips: microchannels can detach and the silicon wafer is easily breakable. The production of an epoxy resin mold from the initial PDMS replicas allows a virtually infinite production of chips while retaining fine details.

1. Pour 45 g of silicon-based organic polymer (PDMS) into a 250 mL plastic cup. Add 5 g of its curing agent (1:10 in weight). Stir the mixture using a plastic pipette for 2–3 min until achieving high bubble content, indicating adequate mixing.
2. Place the mixture within a vacuum desiccator and pump until all air bubbles trapped into the PDMS are eliminated. Watch over the desiccator during vacuum generation: to avoid foam overflow, tap it on the lab bench to break bubbles, or break the vacuum during degassing.
3. Place the master mold in a square 10 cm wide plastic dish and pour the mixture on the mold, close to the surface of the wafer.
4. Place the PDMS-mold device in the oven set at $70\text{ }^\circ\text{C}$ for at least 3 h.
5. Demold the PDMS block, by introducing a plastic micropipette tip between the side of the dish and the PDMS block, and rotating it around the PDMS block several times. When the PDMS block still attached to the wafer can be held, remove both of them carefully from the dish. This step needs to be performed with caution, as the silicon wafer is very brittle.
6. Cut around the silicon wafer and demold the PDMS replica using a scalpel.
7. Cut around (leave a 2 mm margin from future inlets positions) the chip using a scalpel or a razor blade.

8. Repeat steps 1–7 to get a number of PDMS replicas for the production of a big resin mold encoding several chips.
9. Cut adhesive double-sided tape stripes whose size is a little bigger than the PDMS chips. Stick these stripes on the bottom of a silicone mold (cake mold), while keeping a minimum spacing between them (1 cm) and with the silicone mold edges (2 cm).
10. Stick the PDMS chips on these adhesive stripes, circuit side up. Pay attention that the edges of the chips are correctly stuck to the tape, or epoxy resin will infiltrate under the chips.

All steps involving epoxy resin before the 150 °C baking step, including baking itself, should be performed under a fume hood as the vapors are toxic.

11. Pour a volume of epoxy resin base in a disposable plastic cup. Count 250 mL of resin for a 20 cm wide mold.
12. With a pipetboy, introduce 2% (v/v) of the epoxy resin catalyst in the beaker. It is important to avoid making bubbles as much as possible when homogenizing the mix, as they might break the resin during baking. *Trick: inject the catalyst in the resin with the slower mode of the pipetboy while moving the pipet in the liquid resin. Then remove the pipet from the pipetboy and slowly mix following an "8" shape alternatively with circles.*
13. Pour the mixed resin into the silicone mold containing the PDMS chips: be quick and maintain the beaker close to the surface to prevent the formation of bubbles.
14. Put the silicone mold in an oven located under a fume hood, set to 30 °C.
15. Wait 3 h for the resin to polymerize, turn off the oven while letting it closed and let it cool down to room temperature under the fume hood. The polymerization step is strongly exothermic. Avoid brutal temperature changes as they may crack the resin.
16. Remove the epoxy resin from the silicone mold, and the PDMS block and the tape from the resin.
17. Wrap your resin mold into aluminum foil to homogenize temperature changes during the subsequent heating and cooling steps.
18. Place the aluminum-wrapped resin in the same oven and bake at 150 °C overnight in order to evaporate toxic compounds from the resin.
19. Turn off the oven while letting the door closed for progressive cooling down of the resin to room temperature. This step might take several hours.
20. Remove the aluminum foil.

2.2.2.4 Chamber fabrication (see Fig. 4E)

Note: the first two batches of PDMS made with the resin mold will not be suitable for cell culture due to residues of toxic compounds.

1. Repeat steps 1–7 of Section 2.2.2.2 (PDMS replicas production). The silicon/ photoresist mold is now replaced by the resin mold.

14 Microchannels for directed axonal growth

2. Create inlets by pressing the 4 mm diameter biopsy puncher firmly and actuate it to cut and carve openings at both extremities of the culture chambers. The circular structures at the extremities of the culture chambers indicate the positions at which inlets should be generated.
3. Clean the chip by sticking and peeling adhesive tape on the microstructured side. Sprinkle isopropanol on both sides. Then dry the chip with pressurized nitrogen using an air blow gun.
4. Clean the glass coverslips with a dust-free wipe imbibed with isopropanol, then spray them with pressurized nitrogen using an air blow gun.
5. Treat the glass coverslips and the chips, microchannels side up, in the plasma cleaner. Plasma parameters for a Diener Pico PCCE: pumping down pressure: 0.25 mbar; O₂ supply duration: 3 min; gas flow: 10 sccm; maximum deviation: ± 5 sccm; plasma duration: 30 s; set pressure: 0.40 mbar; maximum deviation: ± 0.10 mbar; set power: 50 W; maximum deviation: 5%; venting duration: 45 s.
6. Immediately after plasma treatment, gently put the activated PDMS chip in contact with the glass coverslip, and delicately apply pressure on the chip to bond it to the coverslip. No unbonded regions should subsist between the inlets and the side of the chips, or between distinct inlets.
7. Under the hood and within 30 min after bonding, fill one inlet by chamber with distilled water. This prevents the PDMS from reverting to its original hydrophobic state.
8. Put the assembled chips in petri dishes.

2.2.2.5 Chamber preparation: Day 1 (see Fig. 4F)

1. Place the chips and the petri dishes, open with the inside of the lid facing up, under UV light for 20 min for sterilization.

All steps following UV sterilization should be performed under a cell culture hood with sterile equipment and solutions. To inject liquid into a PDMS chip, place a 1 mL tip cone filled with liquid just above the inlet, then press the pipette to deposit a single drop at the entrance of the inlet. Emptying an inlet can be performed either with an electric pump or a 1 mL micropipette, and should be done with a lot of care after cells have been seeded in the chips.

2. Fill with a 100 μ L pipette cone 30 μ L of a 10 μ g/mL PDL solution in PBS in one inlet per culture chamber. Inject in diametrically opposed inlets (i.e., located on each side of the microchannels). This allows the PDL solution to flow through the microchannels.
3. Incubate overnight in the cell culture incubator regulated at 37 °C and 5% of CO₂. Humidified atmosphere limits evaporation.

2.2.2.6 Cells injection and culture maintenance: From day 0 (see Fig. 4F)

1. Before your dissection protocol, empty the PDL solution from your chips. Introduce a solution of 2.5 μ g/mL laminin in PBS, following the same filling process as with the PDL solution. Incubation should last at least 4 h in the

- cell culture incubator. The flow of laminin solution through the chambers serves as a washing step for PDL. If no laminin is used, perform the same step with PBS.
2. Prepare your dissociated neurons suspension. The protocol used for dissection and dissociation, and the composition of the culture medium can be found in Tan et al. (2018).
 3. Resuspend your neurons at a high concentration in culture medium, here 40 millions cells/mL, using a 200 μ L tip cone.
 4. Empty the laminin from the chips.
 5. Introduce a drop of medium in the two inlets of the culture chamber opposite to the one in which you will introduce the cells (i.e., located on the other side of the microchannels). This prevents the cells from accumulating at the entrance of the microchannels in the cell seeding chamber or even pass through them due to overpressure during the seeding step.
 6. Inject 1.5 μ L of cell suspension at a single inlet of the cell seeding chamber with a 10 μ L tip.
 7. Leave cells to adhere from 5 to 20 min before adding an equal volume of warm culture medium in each inlet.
 8. Add 3 mL of a distilled water+0.5% EDTA solution in the petri dish, around your chip. This helps preventing evaporation. EDTA prevents contamination of the water. Be careful not to cover your chip, as the water+EDTA solution would flow into your culture chambers through the inlets.
 9. Put your chips in the cell culture incubator.
 10. Half of the cell culture medium should be changed at day *in vitro* (DIV) 6 and 13 for primary murine neurons. Water+EDTA level should be maintained during culture duration. If using an electric pump, be careful not to introduce the nozzle to the bottom of the inlet as you may pump the cells out of the chamber.

2.3 IMAGING: ACQUISITION AND DISPLAY

Fluorescence imaging was performed at DIV 11 using a 20 \times magnification. For an efficient automated image analysis, each set of microchannels should be positioned almost identically in the field of view (e.g., be careful to keep a similar orientation of the microchannels between successive images). For repeated imaging (video-microscopy) of live neuronal cultures, be careful to limit laser exposure time to the minimum, as this can be detrimental to neuronal survival. Several Z plans (Z-stack) can be acquired for each position, to account for eventual inclination of the sample.

2.4 AUTOMATED IMAGE ANALYSIS

In the following, the term “structure” represents the microchannels design of a given device. The automated image analysis solution presented here (see Supplementary Material “code_arches_analysis”) primarily relies on a template matching algorithm to extract from a large number of widefield phase contrast images structures

specified manually as templates beforehand by the user. The template matching function first applies a sobel edge detection filter on both the image to analyze and the template, bins both the image and the template to increase processing speed, then generates a convoluted image using the template as the convolution kernel. The positions and intensities of peaks in the convoluted image indicate the position and "quality" of the matches. The script automatically assess what structures are present in each image, their locations and orientations by varying the template and the orientation of the image and looking at the matches quality. This alleviates the need to properly label all the raw images. However, it is primordial that (1) the microstructures from a same type are fabricated in a reproducible fashion and (2) microstructures of different types exhibit significant visual differences, since the template matching function solely relies on geometrical similarity.

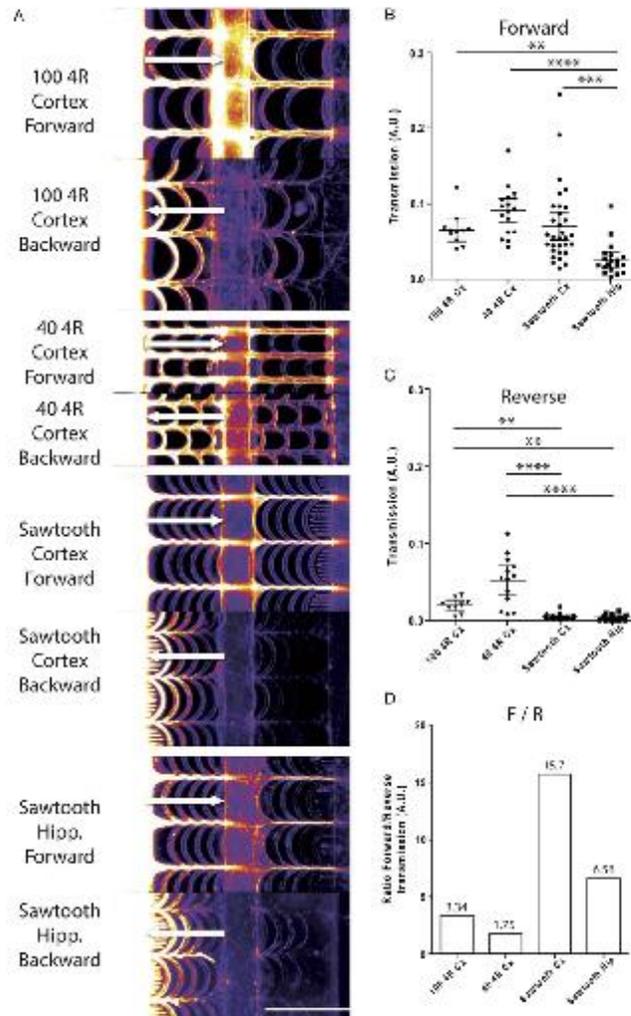
1. Provide a phase contrast (phase) template for each structure for which axonal filtration has to be quantified. A script comprising a graphical user interface makes that task easier.
2. The raw images to be analyzed (Z-stacks) are projected using the max intensity value across the different sections.
3. The orientation and structure type of each projected image are determined by finding the template and angle that yield the best match. The phase and fluorescence images are then aligned based on this orientation.
4. The algorithm determines the positions of the different matches (repeated pattern: here two series of arches+straight microchannels) on the picture, and saves each phase contrast and fluorescence patch to a separate file. Those files are coarsely aligned due to the binning step in the template matching function.
5. All the phase patches for a given structure are loaded into a stack, and realigned with single pixel precision. The shift values are used to align in turn the fluorescence stacks. The direction of axonal growth (forward or reverse) is determined based on the fluorescence intensity in each culture chamber, the side with the cell bodies being much brighter.
6. The transmission values for each image in the stack are calculated as $T = (A - B)/(S - B)$ where A is the fluorescence intensity in the axonal compartment, S in the Soma compartment, and B in a background area devoid of processes.
7. The selectivity for each structure is calculated as the average (T_{forward})/average (T_{reverse}).

3 RESULTS

In this work, we sought to recreate oriented neuronal networks *in vitro* through the use of asymmetric microchannels relying on the "arches" design, as initially described in Renault et al. (2016).

To direct axonal growth, we designed three different microchannels arrays. The first one contains 10 μm wide straight microchannels linked by 100 μm diameter, 10 μm wide arches (Fig. 2D). 6 and 7 repeats of these arches were drawn on every pair of microchannels, but 2 are buried under the central chamber during microfabrication, thus reducing to 4/5 the number of arches. Therefore, circuits containing this design will be referred to as “arches 100 4R.” Another variant relies on the presence of 40 μm instead of 100 μm diameter arches (Fig. 2E), and will be referred to as “arches 40 4R.” The last variant was designed with 9 repeats of 100 μm diameter arches and a greater proximity of the cusps formed by those arches in an effort to maximize their number (Fig. 2F). A central space was managed for the central chamber. These will be called “sawtooth arches” in reference to the frequent repetition of pointed cusps along the microchannels. In each design, the “forward,” permissive direction of axonal growth goes from left to right. The non-permissive one will be referred as “reverse.” Each of them contains opposed funnels and traps adjacent to the culture chambers for respectively harvesting and filtering a maximum number of neuronal processes before microchannel openings.

We evaluated the axonal transmission of these different designs in the “forward” (neurons seeded in the “emitting” chamber) and “reverse” directions (neurons seeded in the “receiving” chamber). To this end, primary murine cortical (Cx) or hippocampal neurons (Hip) extracted from a tdTomato-expressing mouse line were seeded in the emitting or receiving culture chambers, as pictured in Fig. 4F, and left to grow for 11 days before being imaged with phase contrast and fluorescence microscopy. Image analysis is a laborious task when performed manually. We thus aimed to develop an automatized solution achieving a visual estimation of the average density of axons in the forward and reverse directions and to obtain a preliminary numerical estimation of the transmission coefficients. This technique, already used in Renault et al. (2016), is described in Section 2. This process allowed for the fast analysis of a consequent amount of pictures with minimal human input, and the pre-selection of designs with the most promising features. Fig. 5 presents the results of this analysis, with average axonal paths pictured in Fig. 5A. The selectivity values obtained from the ratio between forward and reverse transmission coefficients generated by the script were 3.34 for the “100 4R” design, 1.75 for “40 4R” and 15.67 for sawtooth arches seeded with Cx. A 6.56 transmission ratio value was calculated in the sawtooth arches seeded with hippocampal neurons (Fig. 5D). A closer examination of these pre-screening results revealed that the differences in the transmission ratio were not due to the forward transmission value in the designs seeded with Cx, which were similar in the three designs (Fig. 5B), but to differences in reverse transmission values. These values were extremely decreased in sawtooth arches, mildly reduced in arches 100 4R and still elevated in arches 40 4R (Fig. 5C). The transmission ratio obtained for Hip in sawtooth arches was the result of a weaker axonal transmission in the forward direction compared to Cx, while reverse growth was still extremely weak in the reverse direction. These preliminary results allowed for classifying our designs according to their filtration power, and indicated that sawtooth arches had the best performances.

**FIG. 5**

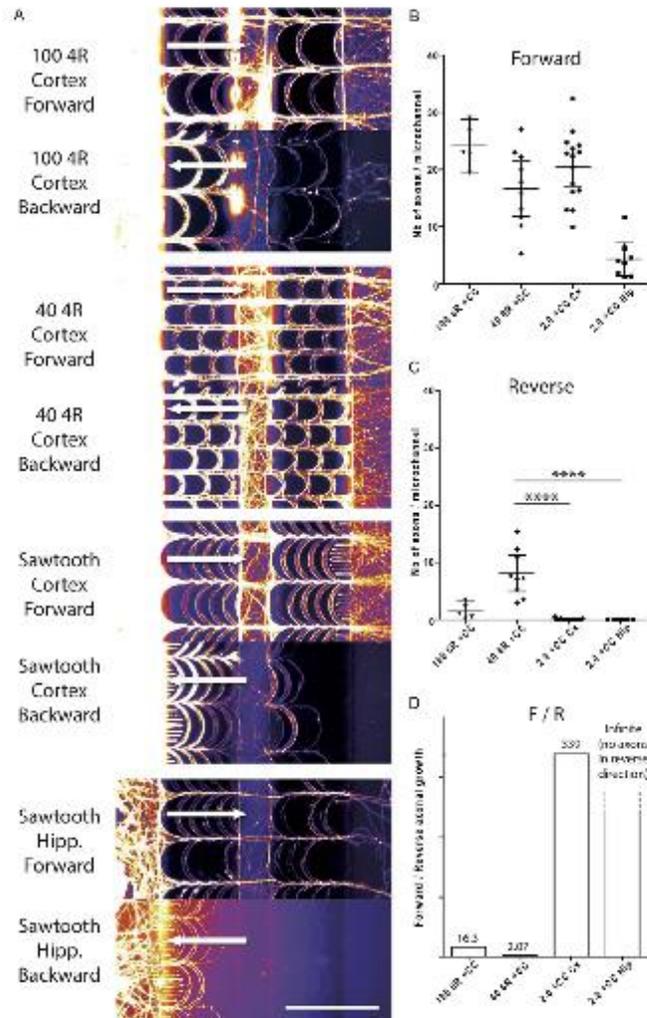
See legend on opposite page.

Although this automatic method allowed for easy and fast analysis of the pictures and for the classification of the designs based on their filtration efficiency, it did not completely reflect the reality, in particular in the cases where the reverse transmission is very low, i.e., when the process of background subtraction is of critical importance. Indeed, a closer examination of individual pictures (Fig. 6A) revealed that reverse axonal outgrowth was quasi nonexistent in sawtooth arches, with an average of 0.12 axons per microchannel growing in the reverse direction for Cx and no axon at all when hippocampal neurons were seeded. In comparison, an average of 1.48 and 8.02 axons per microchannel crossed the "100 4R" and "40 4R" arches in the reverse direction, respectively (Fig. 6C). Axonal outgrowth from cortical neurons in the forward direction was extremely robust in the three structures, with an average 24.16, 16.59 and 20.4 axons per microchannel for the "100 4R," "40 4R" and sawtooth arches, respectively. Hippocampal forward axonal outgrowth in sawtooth arches was quite weak, with 4.28 axons per microchannel (Fig. 6B). Calculation of the transmission ratios from these manually acquired values showed that sawtooth arches allowed a selectivity of 339 (99.7%) ($n=15$ cultures in 3 separate experiments, with 10 microchannels per replicate). This value was infinite (100%) for hippocampal cultures, as no axon crossed in the reverse direction ($n=7$ cultures in 2 separate experiments, with 10 microchannels per replicate). Arches "100 4R" and "40 4R" had respective selectivity of 16.3 (93.9%) and 2.07 (51.7%) (Fig. 6D). To our knowledge, the sawtooth arches present the best axonal filtration ratios described in the literature for this level of compactness and innervation density.

The next step was to assess how sawtooth arches fare in a network situation. To this end, we seeded the emitting chamber of the circuit with wild-type cortical neurons, while tdTomato-expressing hippocampal neurons were introduced in the receiving compartment. Cultures were imaged after 11 days of culture (Fig. 7). We observed minimal hippocampal outgrowth to the emitting chamber (Fig. 7B). Filtration of hippocampal neurons was thus similar when neurons were seeded in only one chamber or both, with an average of respectively 0 (Fig. 6C) and 0.05 axons

FIG. 5

Automatic preliminary screening of axonal growth through asymmetric microchannels. Neurons extracted from a tdTomato-expressing mouse line were either seeded in the "emitting" ("Forward" situation) or "receiving" ("Backward" situation) culture chambers and left to grow for 11 days. Signal corresponds to tdTomato fluorescence. (A) Cortical ("Cortex") neurons were seeded on either side of culture devices containing 100 μm arches with 4 repeats ("100 4R"), 40 μm arches with 4 repeats ("40 4R") or "sawtooth" arches. Hippocampal ("Hipp.") neurons were in addition seeded on either side of "sawtooth" arches. Scale bar is 200 μm . (B) Quantification of the average transmission (signal intensity in the axonal chamber normalized by signal intensity in the somatic chamber, both minus background signal) in the "forward" direction, and (C) in the "reverse" direction. Error bars correspond to 95% confidence interval (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). N = minimum two independent experiments. (D) Ratio of the average "forward" on "reverse" transmissions.

**FIG. 6**

See legend on opposite page.

growing in the reverse direction (Fig. 7C). This supports the notion that our design allows for the reconstruction of extremely directed neuronal networks *in vitro*.

4 DISCUSSION

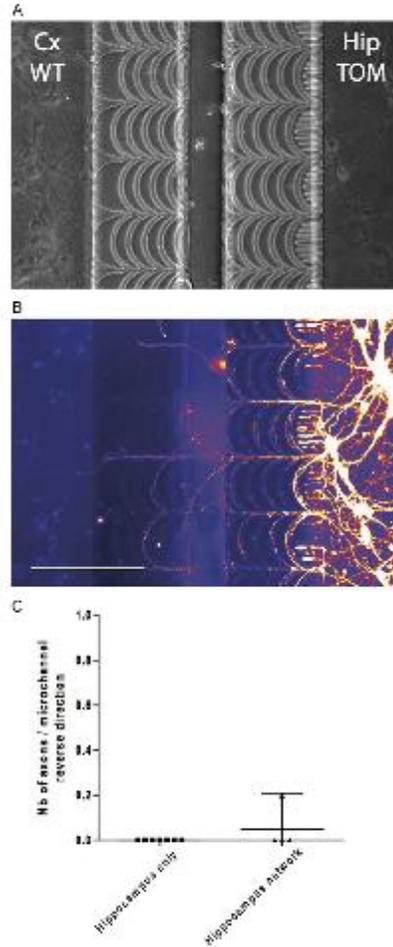
We have described in this methodological work several microchannels designs relying on the “arches” paradigm reported in Renault et al. (2016) and evaluated their filtration power first through an automatic pre-screening technique and then through quantification at the single axon level. All these designs aimed at filtering axonal growth in a unidirectional fashion between two neuronal cultures. Importantly, the “sawtooth” channels described here exhibited very good filtration characteristics. We obtained a filtration ratio at DIV 11 of 99.7% for cortical neurons and of 100% for hippocampal neurons. Importantly, this characteristic was preserved in a network situation where both chambers were seeded. To our knowledge, we describe yet the most efficient axonal filtration system through the use of short and compactly interspaced microchannels.

Sawtooth arches exhibited a very high axonal filtration in the reverse direction, significantly higher than the two other designs. This might be linked to the higher number of arches, 9 instead of 4 per straight microchannel. Indeed Renault et al. (2016) described a progressive filtration of axons at each arches repeat, thus supporting an additive property (although non-linear) of arches succession. Another factor to take into account was the closer proximity of successive cusps and their increased acuteness as compared to 100 μ m diameter arches. This characteristic might result in a more severe filtration of reverse axonal growth.

Of great interest, sawtooth arches were able to constrain reverse axonal growth in a network situation, while the design of 100 μ m diameter arches reported in Renault et al. (2016) displayed reduced filtration capacities in a similar context. This might be due to an earlier filtration of reverse axonal growth, thus minimizing the probability

FIG. 6

Axonal growth through asymmetric microchannels. Neurons extracted from a tdTomato-expressing mouse line were either seeded in the “emitting” (“Forward” situation) or “receiving” (“Backward” situation) culture chambers and left to grow for 11 days. Signal corresponds to tdTomato fluorescence. (A) Cortical (“Cortex”) neurons were seeded on either side of culture devices containing arches 100 μ m 4 repeats (“100 4R”), arches 40 μ m 4 repeats (“40 4R”) or “sawtooth” arches. Hippocampal (“Hipp.”) neurons were seeded on either side of “sawtooth” arches. Scale bar is 200 μ m. (B) Quantification of the number of axons per microchannel reaching the other chamber in the “forward” direction, and (C) in the “backward” direction. Error bars correspond to 95% confidence interval (***p < 0.0001). N = minimum two independent experiments. (D) Ratio of the average “forward” on “backward” axon growth.

**FIG 7**

Minimal retrograde axonal growth in cortico-hippocampal networks. Hippocampal neurons extracted from a tdTomato-expressing mouse line were seeded in the "receiving" culture chamber of a "sawtooth" arches microfluidic chips while cortical neurons from a wild-type mouse line were seeded in the "emitting" culture chamber. (A) Phase contrast and (B) tdTomato fluorescence. Scale bar is 200 μ m. (C) Quantification of the number of hippocampal axons by microchannels growing in the reverse direction at DIV 11, with only TOM hippocampal neurons being seeded in the receiving chamber, or with WT cortical neurons (Cx) seeded in the emitting chamber and TOM hippocampus (Hip TOM) seeded in the receiving one. Error bars correspond to 95% confidence interval.

that axons growing in the reverse direction would be guided by axons traveling in the forward direction through a fasciculation phenomenon.

The filtration of hippocampal and cortical axons differed in our design, and can be attributed to the differences between the fasciculation properties of these two neuronal subtypes. Indeed, we observed (Fig. 5A) that cortical axons remained bundled in the central channel whereas the bundles formed by hippocampal neurons inside the microchannels tend to defasciculate right at their exit, leading to a decreased forward transmission compared to cortical neurons. This observation supports the notion that axons of each neuronal subtype has unique axonal navigation parameters. These features should be taken into account when planning on reconstructing neuronal networks, and filtration efficiency should be evaluated for each new subtype before doing so.

The automatic image analysis script we presented here allowed for fast and easy display of a vast amount of images, and to a preliminary classification in terms of transmission and axonal selectivity. However, the transmission ratios generated by this method are quite underestimated due to the sensitivity of this method to the value of the background signal. Altogether, this solution still represents a convenient process for pre-screening a vast number of structures before precisely quantifying the most promising ones.

The arche-based microchannels designs presents several advantages over a funnel-shaped design, including less severe mechanical constraints as already discussed in Renault et al. (2016). We provide here a methodology to design and fabricate variants of arche-based devices to achieve selectivity above 99.7%. Interestingly, a filtration efficiency of 100%, although not demonstrated in a network setting, was described in Na et al. (2016). This method relied on axonal “memory” of previous path, which meant that the longer an axon follows a straight path in a microchannel, the higher the probability it will not deviate from this path if it encounters an alternative route. One of the disadvantages presented by this device is the low density of microchannels, with one microchannel every 500 μm , 5 times lower than for sawtooth arches. This characteristic might impede the reconstruction of a functional network. Moreover, the total microchannel length needed for efficient filtration was 1.5mm, >3 times longer than for our device, in which the microchannels are 400 μm long.

Arche-based microchannel designs open the way for the reconstruction of physiologically relevant models for the study of pathological processes occurring in neuronal networks. Of particular importance is the possibility to build composite networks with various neuronal subtypes and mutant neurons. The independent access to each of the neuronal compartments permits the individual stimulation, inhibition, treatment, transfection and observation of each of the network nodes. One of the main research areas that could benefit from this technological achievement is the study of the trans-neuronal transfer of pathological agents. Indeed, the study of the propagation of prion-like phenomena—involved in Alzheimer’s and Parkinson’s diseases among others—in neuronal networks can currently only be performed with bidirectional systems (Mao et al., 2016; Tran et al., 2014) or with hybrid co-cultures

(Calafate et al., 2015). As the directionality of this propagation is still the subject of debates in the scientific community (Uchihara & Giasson, 2016), being able to address this question directly in extremely directed networks would improve our comprehension of the etiology of these diseases.

ACKNOWLEDGMENT

Part of this work was supported by the European Research Council Advanced Grant Number 321107 "CellO".

REFERENCES

- Calafate, S., Buist, A., Miskiewicz, K., Vijayan, V., Daneels, G., de Strooper, B., et al. (2015). Synaptic contacts enhance cell-to-cell tau pathology propagation. *Cell Reports*, *11*(8), 1176–1183.
- Campanot, R. B. (1977). Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(10), 4516–4519.
- Chubakov, A. R., & Sotnikov, O. S. (1982). Formation of connections between the raphe and hippocampal nuclei in tissue culture (intravital functional and morphological studies). *Arkhiv Anatomii, Gistologii i Ėmbriologii*, *82*(3), 11–20.
- Corey, J. M., Wheeler, B. C., & Brewer, G. J. (1991). Compliance of hippocampal neurons to patterned substrate networks. *Journal of Neuroscience Research*, *30*(2), 300–307.
- Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Alleaume-Butaux, A., Hjorth, J. J., Vignes, M., et al. (2013). Synapto-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. *PLoS One*, *8*(8), e71103.
- Deleglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., et al. (2014). β -Amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. *Acta Neuropathologica Communications*, *2*, 145.
- Gladkov, A., Figareva, Y., Katyina, D., Kolpakov, V., Bukatin, A., Mukhina, I., et al. (2017). Design of cultured neuron networks in vitro with predefined connectivity using asymmetric microfluidic channels. *Scientific Reports*, *7*(1), 15625.
- Kale, P., Zalesky, A., & Gollo, L. (2018). Estimating the impact of structural directionality: How reliable are undirected connectomes? *Network Neuroscience*, *1*, 1–51.
- Le Feber, J., Postma, W., De Weerd, E., Weushof, M., & Rutten, W. L. (2015). Barbed channels enhance unidirectional connectivity between neuronal networks cultured on multi electrode arrays. *Frontiers in Neuroscience*, *9*, 412.
- Mao, X., Ou, M. T., Karuppagounder, S. S., Kam, T. I., Yin, X., Xiong, Y., et al. (2016). Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science*, *353*(6307), aah3374.
- Na, S., Kang, M., Bang, S., Park, D., Kim, J., Sim, S. J., et al. (2016). Microfluidic neural axon diode. *Technology*, *04*, 240–248.
- Peyrin, J. M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., et al. (2011). Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab on a Chip*, *11*(21), 3663–3673.

- Renault, R., Durand, J. B., Viovy, J. L., & Vilard, C. (2016). Asymmetric axonal edge guidance: A new paradigm for building oriented neuronal networks. *Lab on a Chip*, *16*(12), 2188–2191.
- Renault, R., Sukenik, N., Descroix, S., Malaquin, L., Viovy, J. L., Peyrin, J. M., et al. (2015). Combining microfluidics, optogenetics and calcium imaging to study neuronal communication in vitro. *PLoS One*, *10*(4), e0120680.
- Tan, V. X., Lassus, B., Lim, C. K., Tixador, P., Courte, J., Bessede, A., et al. (2018). Neurotoxicity of the cyanotoxin BMAA through axonal degeneration and intercellular spreading. *Neurotoxicity Research*, *33*(1), 62–75.
- Taylor, A. M., Blurton-Jones, M., Rhee, S. W., Cribbs, D. H., Cotman, C. W., & Jeon, N. L. (2005). A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nature Methods*, *2*(8), 599–605.
- Taylor, A. M., Dieterich, D. C., Ito, H. T., Kim, S. A., & Schuman, E. M. (2010). Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. *Neuron*, *66*(1), 57–68.
- Tran, H. T., Chung, C. H., Iba, M., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., Luk, K. C., et al. (2014). Alpha-synuclein immunotherapy blocks uptake and templated propagation of misfolded alpha-synuclein and neurodegeneration. *Cell Reports*, *7*(6), 2054–2065.
- Uchihara, T., & Giasson, B. I. (2016). Propagation of alpha-synuclein pathology: Hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathologica*, *131*(1), 49–73.
- Virlogeux, A., Moutaux, E., Christaller, W., Genoux, A., Bruyere, J., Ffno, E., et al. (2018). Reconstituting corticostriatal network on-a-chip reveals the contribution of the presynaptic compartment to Huntington's disease. *Cell Reports*, *22*(1), 110–122.
- Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., & Lee, V. M. (2014). 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. *Nature Protocols*, *9*(9), 2135–2146.
- Wyart, C., Ybert, C., Bourdieu, L., Herr, C., Prinz, C., & Chatenay, D. (2002). Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces. *Journal of Neuroscience Methods*, *117*(2), 123–131.

Discussion

Nous avons publié une forme de microcanaux asymétriques permettant d'orienter à 99.7% la pousse des axones corticaux et 100% la pousse des axones hippocampaux de cultures primaires murines ensemencées dans l'un ou l'autre des compartiments reliés par les microcanaux, l'un des meilleurs taux de filtration présents dans la littérature. L'isolation fluïdique entre les deux compartiments peut être maintenue pendant 24h. Cependant, la filtration axonale n'avait pas été estimée lorsque les deux compartiments sont ensemencés, et quelques défauts étaient améliorables. J'ai donc développé une nouvelle version du système permettant de reconstruire des réseaux de neurones 100% unidirectionnels. Ce système est décrit dans l'article n°3, qui détaille également les résultats expérimentaux obtenus avec celui-ci.

Génération de systèmes microfluidiques

J'ai développé plusieurs systèmes microfluidiques au cours de ma thèse, dont certains dans le cadre de collaborations encore en cours. J'ai notamment essayé de développer un système permettant de générer des réseaux orientés pour étudier la propagation rétrograde de l'agrégation. Dans un tel système, les neurones de la chambre i indiquée sur la Figure XC devaient pousser jusqu'à la chambre ii, et les neurones de la chambre ii ne devaient être en mesure de n'envoyer leurs axones que vers la chambre iii et pas la chambre i. Les axones de ii devaient pouvoir être exposés à des agrégats dans la chambre iii, et ainsi permettre d'observer si l'agrégation pouvait se propager jusqu'aux neurones de la chambre i, *via* un transfert interneuronal rétrograde (Fig 31A). Cependant, dans ces systèmes, les axones hippocampaux et corticaux ont poussé sur des distances beaucoup plus grandes que celles que nous envisagions, certains axones s'étendant jusqu'à plus de 2mm et atteignant la chambre iii depuis la chambre i (Fig 31B, C).

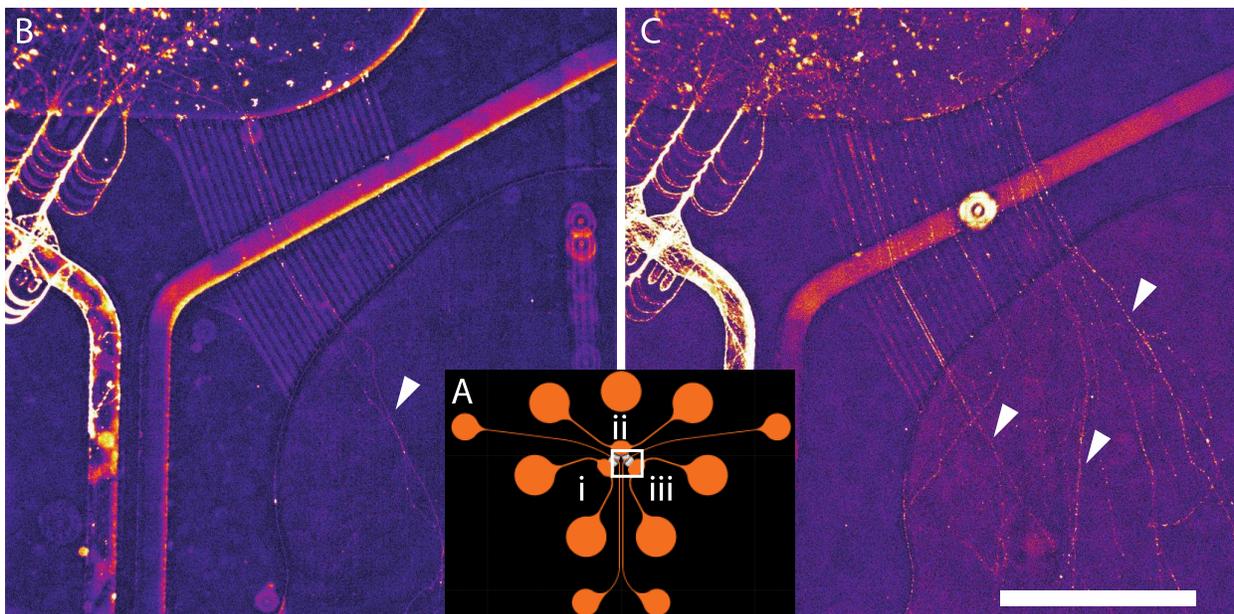


Figure 31 - Croissance d'axones de cultures primaires sur de très longues distances
(A) Représentation schématique du système visant à reconstruire des réseaux orientés à trois composants. Les chambres i, ii et iii (orange) sont reliées par des microcanaux (blanc) de type "arches" entre i et ii et des microcanaux droits entre ii et iii. (B & C) Zoom sur la partie encadrée en (A). (B) Des neurones hippocampaux ont été ensemencés dans la chambre i et ii, ceux de la chambre i étant extraits d'embryons exprimant la protéine fluorescente tdTomato. (C) Idem avec des neurones corticaux. Les flèches indiquent les axones provenant de la chambre i innervant la chambre iii. Barre d'échelle : 500um.

Suite à ces difficultés techniques, j'ai souhaité développer un système pour reconstruire des réseaux de neurones à deux composants permettant d'étudier la propagation rétrograde ou antérograde de l'agrégation, et d'étudier l'importance des contacts synaptiques dans cette propagation. Ce système repose sur l'utilisation de la technique d'*in-mold patterning* dont le principe est donné dans la Figure 22C. Cette technique de patterning permettant la séparation fluidique de différentes parties du pattern sans interrompre la pousse axonale, j'ai proposé un design (Fig 32) permettant de connecter deux population A et Bensemencées respectivement dans les compartiments 1 et 2 de la Figure 32B, cependant que les axones de la population B poussent jusqu'à la chambre 3, permettant leur perfusion sélective avec des agrégats. Ce système a également pour but d'évaluer l'importance des contacts synaptiques dans la propagation de l'agrégation, l'une des versions ne contenant pas de zone adhésive entre les somas de neurones de B et les axones des neurones de 1 (Fig 32C et 32D). La fabrication de tels dispositifs étant ardue et le protocole améliorable, ce projet a été repris par une stagiaire que j'ai encadrée, qui travaille maintenant, entre autres, à améliorer ce système dans le cadre de son projet doctoral. Ce système permettrait à maturité de reconstruire des réseaux neuronaux complexes à plusieurs composants. Il aurait également l'avantage, par rapport aux systèmes basés sur la forme des microcanaux, de permettre à un plus grand pourcentage des neurones dans chaque compartiment d'envoyer ses prolongements axonaux vers d'autres populations. En effet, dans les systèmes que j'ai utilisés pour mes expériences dans des réseaux reconstruits, de 5 à 20% des neurones seulement, selon le système, sont en mesure d'envoyer leurs axones vers l'autre compartiment.

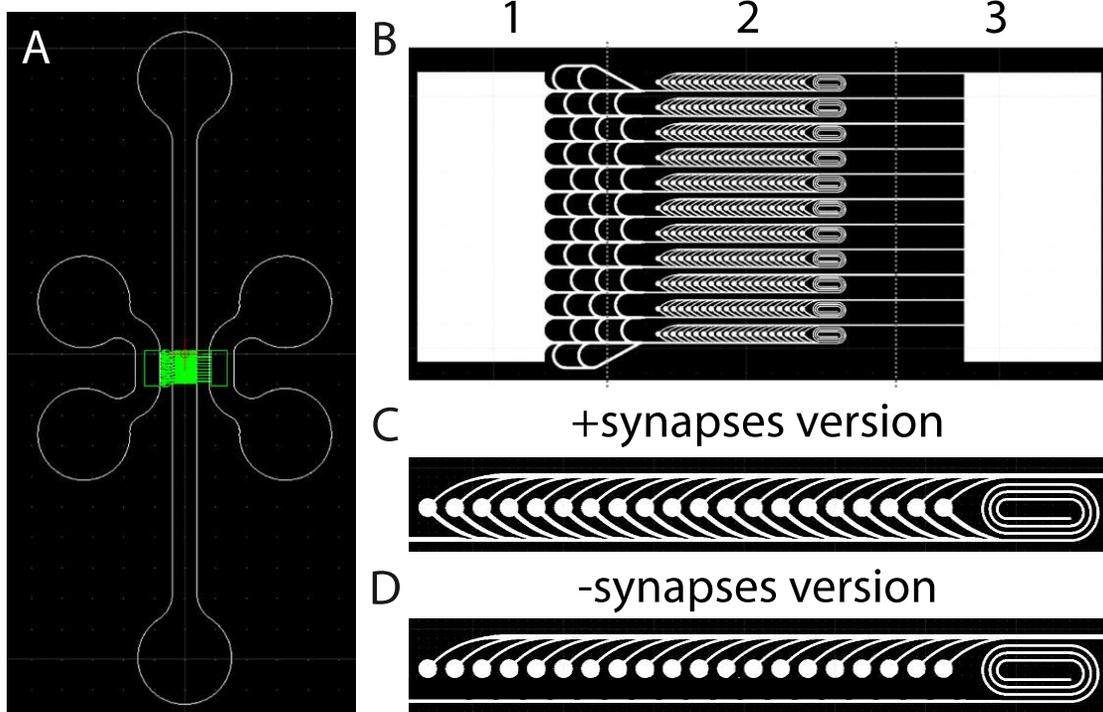


Figure 32 - Design du système avec *in-mold patterning* pour la reconstruction de réseaux de neurones avec ou sans contacts synaptiques

(A) Vue d'ensemble du dispositif. Trois chambres pour la perfusion sélective de sous-parties du réseau sont indiquées en blanc, et le motif pour l'*in-mold patterning* est indiqué en vert. (B) Zoom sur la partie *in-mold patterning*. Les trois compartiments séparément perfusables sont indiqués par les chiffres 1 à 3, et en pointillés l'isolation fluide entre les différentes sous-parties du réseau. Les neuronesensemencés en 1 ont une large zone d'adhésion, et les neurones en 2 ont accès à des zones d'adhésion limitées, de forme circulaire. (C & D) Zoom sur le motif d'*in mold patterning* dans le compartiment 2. Un "piège" permettant de capturer les axones provenant de la chambre 1 est visible à droite, et les zones circulaires d'adhésion pour les corps neuronaux sont également visibles. La présence ou non de zones d'adhésion entre les corps cellulaires en 2 et les axones provenant de 1 doit permettre ou non les contacts synaptiques entre les populations neuronales.

Article 3 - Modélisation de la propagation prion-like de l'aSyn dans des réseaux de neurones reconstruits 100% orientés - en cours de préparation

Introduction

Comme expliqué dans l'introduction de ce manuscrit, de nombreuses questions restent encore sans réponse dans l'étiologie de la maladie de Parkinson, dont les déterminants de la progression prion-like de l'agrégation de l'aSyn dans des réseaux de neurones hétérogènes. Notamment, l'impact des connections synaptiques sur la propagation interneuronale de l'agrégation, et l'impact de la nature de la population "émettrice" sur l'efficacité de la propagation de l'agrégation à une population "réceptrice" n'est pas connu, et deux scénarios détaillés dans la Figure 27 sont envisageables. Les systèmes de culture classiques, ou de reconstruction de réseaux de neurones disponibles au début de ma thèse ne permettaient pas d'aborder ces questions *in vitro*. Quant aux modèles *in vivo* d'injection intracérébrale d'agrégats d'aSyn dans, ils ne permettent pas de déterminer le chemin emprunté par l'agrégation pour se propager dans le SNC, les connections entre régions étant extrêmement abondantes. Qui plus est, réaliser des mutations locales dans les réseaux de neurones *in vivo* est un long travail, nécessitant l'utilisation de modèles transgéniques possédant des promoteurs propres à une région, ou d'autres techniques. Dans ce cadre, il est extrêmement intéressant de pouvoir reconstruire des réseaux de neurones 100% orientés et d'y étudier la propagation de l'agrégation de l'aSyn.

Dans cet article, j'ai amélioré le système décrit dans ma publication de 2018 pour y porter la filtration axonale à 100% lorsque les deux compartiments sontensemencés avec des cultures neuronales primaires corticales ou hippocampales. Nous dénommons ce système "arches 2.1" au sein de l'équipe. J'ai exposé le compartiment présynaptique de ces systèmes à des agrégats exogènes d'aSyn fluorescents, et ai suivi la dissémination de ces agrégats aux neurones postsynaptiques. J'ai également marqué les inclusions d'aSyn endogène pour déterminer si l'agrégation pouvait se propager dans les réseaux de neurones. Ce système permettant l'introduction de populations

neuronales choisies, j'ai reconstruit des réseaux hippocampo-hippocampaux, cortico-hippocampaux, exprimant ou non l'aSyn dans leur compartiment présynaptique.

J'ai tenté de modifier la connectivité synaptique entre les deux compartiments de deux façons différentes : soit en comparant des réseaux plus ou moins matures, soit en provoquant une toxicité synaptique. Cette deuxième approche se base sur les observations réalisées par un ancien doctorant de notre équipe dans des réseaux cortico-striataux. Cependant, je n'ai pas observé de perte de synapses suivant ce protocole dans des réseaux hippocampo-hippocampaux, ce qui suggère que ce type de réseau réagit différemment à ce traitement pharmacologique (Figure 33). L'impact des connections synaptiques n'a donc été inféré à l'heure actuelle que par comparaison des réseaux plus ou moins matures.

Les résultats présents dans la version actuelle de ce manuscrit ne sont pas au complet. Notamment, la quantification de la densité synaptique n'est pas achevée, une expérience démontrant que les synapses sont bien formées entre les deux compartiments est en cours et les résultats de propagation de l'agrégation dans les réseaux composites *SNCA*^{-/-} vers *SNCA*^{+/+} sont en cours de complétion. La méthode d'analyse des synapses est à corriger, car bien que celle-ci permette de mettre en évidence une différence entre les différentes conditions, le nombre de synapses par um est plus élevé que ce qui apparaît au microscope. Les données entre Fibres humaines et murines sont difficilement comparables, car leur fluorescence intrinsèque diffère. Je réalise donc une courbe-étalon pour pouvoir formellement les comparer.

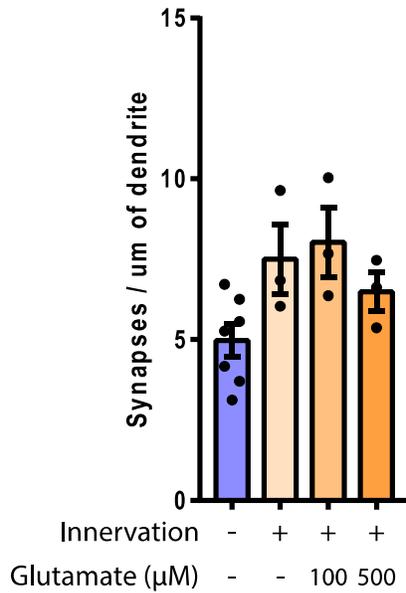


Figure 33 - Tentative d'induction d'une toxicité synaptique *in vitro*

Des réseaux hippocampo-hippocampaux reconstruits dans le système "arches 2.1", et exposés à DIV20 à différentes concentrations de glutamate dans le compartiment présynaptique, dans le but de provoquer une perte de synapses. Les réseaux ne contenant pas de neurones dans la partie présynaptique (bleu) forment moins de synapses que ceux dont les deux compartiments ont étéensemencés, indiquant qu'une partie des synapses observées dans le compartiment postsynaptique sont formées entre les neurones des deux compartiments. Les cultures exposées à des doses croissantes de glutamate ne présentent pas de perte forte des synapses. Chaque point correspond à la quantification d'au moins 30 neurites.

Alpha-synuclein propagation in fully oriented *in vitro* neural networks suggests non-synaptic transfer mechanisms.

Courte J, Le NA, Bousset L, Melki R, Villard C, Peyrin JM.

Introduction

Prion-like spreading of alpha-synuclein (aSyn) aggregates in neural networks is thought to underlie the spatiotemporal progression of synucleinopathies such as Parkinson's disease (PD) in the central nervous system (CNS). aSyn aggregation can be seeded by aSyn pre-formed fibrils (PFFs) *in vitro* and *in vivo* (Luk et al., 2012a, 2009; Wood et al., 1999). aSyn inclusions are termed Lewy pathology (LP). Strikingly, LP appears following a conserved pattern in a significant subpart of patients, supporting that spreading occurs in a non-random fashion (Heiko Braak et al., 2003; Rietdijk et al., 2017). Interconnected nuclei sequentially develop LP, thus suggesting that prion-like propagation follows neuroanatomical connectivity and not a "closest neighbour" rule. Nevertheless, the factors governing non-random spread of LP in neural networks are still unknown. It is often assumed that aSyn aggregation spreads in a "trans-synaptic" fashion, with synaptic structures serving as vectors of inter-neuronal dissemination of seeding aggregates. This hypothesis is compatible with the pattern of sequential development of Lewy pathology (LP) following intracerebral PFFs injection in animals (Masuda-Suzukake et al., 2013; Rey et al., 2018, 2016, 2013).

However, synaptic connectivity alone does not suffice to explain the predictable development of LP in patients (Surmeier et al., 2017), and aSyn PFF have been reported to be transferred from neuron to neuron in a synapse independent fashion (Brahic et al., 2016; Danzer et al., 2011; Freundt et al., 2012). These observations imply that the role of synapses in aSyn aggregation spread is still unclear, and that intrinsic characteristics of brain regions modify the course of disease progression. Yet, synapses are attractive candidates for mediating aggregation propagation, as they tightly link

plasma membranes, are a hotspot of membrane remodelling (Gross and von Gersdorff, 2016), contain most of the CNS pool of aSyn in their presynaptic moiety (Galvin et al., 2001; Iwai et al., 1995; Withers et al., 1997), and harbour a number of extracellular receptors of aSyn aggregates (Holmes et al., 2013; Mao et al., 2016; Shrivastava et al., 2015).

Selective vulnerability of neuronal populations to aSyn aggregation spreading might result from several mechanisms, such as a higher propensity to internalize seeding aSyn assemblies, to subsequently undergo seeding of endogenous aSyn, or being connected to a neural population very efficient in sending seeding aggregates. How these different parameters interact to govern the spread of aSyn aggregation in neural networks is still unknown.

Addressing the network level impact of these characteristics *in vivo* is challenging. Indeed, neuronal connectivity in the mammalian brain is abundant and intricate, rendering the interpretation of spreading experiments delicate (Rey et al., 2016, 2013). Locally perturbing these different parameters requires targeted genetic modification or pharmacological treatment, and not knowing the route of spreading might complicate interpretation of experimental results. In this context, the *in vitro* reconstruction of compartmentalized neural networks is a promising approach. This technique allows for the independent perfusion of neuronal populations connected through axon-permissive microchannels (Taylor et al., 2005). These systems have defined connectivity, and networks can be made up of various neuronal populations. However, bidirectional systems are not appropriate for studying the inter-neuronal spread of propagative agents such as aSyn aggregates. Indeed, selectively introducing aSyn aggregates in one compartment might result in their direct uptake by axons growing through microchannels from the unexposed compartment (Volpicelli-Daley et al., 2011). Thus, spreading of aggregation to the other compartment cannot be attributed with certitude to neuron to neuron transfer of aggregates, but might instead be due to direct axonal uptake of aggregates. Several strategies have been proposed to selectively filter axonal growth in one direction, in order to reconstruct fully oriented neural networks (Gladkov et al., 2017; le Feber et al., 2015; Na et al., 2016; Peyrin et al., 2011). However, no system to date has been able to fill in all the requirements for the study of inter-neuronal propagation of pathological agents: 1) fluidic

isolation, 2) fully oriented axonal growth and 3) robust innervation of the postsynaptic compartment.

We describe here a system which fully comply with these specifications. We improved on the previously described "arches" (Renault et al., 2016) and "sawtooth" systems (Courte et al., 2018), allowing us to reconstruct 100% oriented binary networks. Unidirectional axonal filtration relies on incurved microchannels which selectively hamper axonal growth from the "postsynaptic" compartment, while allowing its crossing from the "presynaptic" compartment. We used this system to study the impact of various parameters on the anterograde propagation of aSyn aggregation: synaptic connectivity, the nature of the presynaptic population and the presynaptic expression of aSyn. While we were able to observe anterograde transfer of fluorescent exogenous aggregates of human and murine aSyn, we did not detect aggregation of endogenous aSyn in the postsynaptic neurons 10 days after introduction of aggregates in the presynaptic compartment. This suggests that anterograde propagation of aggregation is a slow process, and that an increase of neuronal susceptibility to conformational conversion of aSyn is required for aSyn aggregation spread to be studied in such a short experimental timeframe.

Results

Reconstruction of fully oriented neural networks in vitro

Reconstruction of *in vitro* oriented neural networks is a promising technique to study the inter-neuronal spread of propagative agents. This kind of device consists in two culture chambers linked by an array of microchannels, whose height allows axonal outgrowth while preventing cellular migration between the compartments (Fig 1A). The asymmetric design of these microchannels is such as to prevent axonal growth in one direction while allowing it in the reverse one. Those systems allow the introduction of various neuronal populations in the presynaptic and postsynaptic compartments and their selective perfusion with molecular compounds. A previous version of this system containing funnel-shaped microchannels allowed for 97% orientation of axonal growth, and has previously allowed us to screen synapto-protective compounds (Deleglise et al., 2013), study the toxic consequences of presynaptic exposure to amyloid beta peptides on postsynaptic neurons (Deleglise et al., 2014), demonstrate trans-synaptic degeneration mediated by glutamatergic signalling (Deleglise et al., 2018) and identify a mediator of cortico-striatal synchrony (Lassus et al., 2018b). However, this system as well as the others available did not allow for the reconstruction of fully oriented neural networks, and thus hindered the study of the spread of pathological self-propagative processes. Indeed, axons growing in the “retrograde” direction could directly internalize through such agents and allow their retrograde propagation to neuronal somas. We previously published a shape of asymmetric microchannels allowing for 99.7% orientation of axonal growth when primary neurons were seeded on one side or the other (Courte et al., 2018). This system allows the fluidic isolation of the two compartments with a pressure gradient. We improved the shape of these asymmetric microchannels (Fig 1B) by diminishing the width of inter-arches space and enlarging the axonal “traps” on the postsynaptic side. Primary neurons seeded in both compartments can be cultured for several weeks, and synaptic structures can be detected in neurons on the postsynaptic side at 20 days of culture (Fig 1C). We assessed the efficiency of

axonal filtration in networks by seeding neurons extracted from a mouse line constitutively expressing the tdTomato fluorescent protein (*tdTom^{+/-}*) on either the presynaptic or the postsynaptic side while seeding non-fluorescent primary neurons (*tdTom^{-/-}*) on the other side. While neurons seeded in the presynaptic compartments sent a significant number of axons to the postsynaptic compartment after 17 days *in vitro* (DIV), no axons growing from the postsynaptic to the presynaptic compartment could be detected (Fig 1D). This held true for hippocampo-hippocampal networks as well as cortico-hippocampal networks. The axonal filtration rate in both of these co-culture models is 100%, as evaluated in 12 separate networks in 3 individual experiments. Axonal innervation from the presynaptic compartment to the postsynaptic compartment increased over time, between 13 and 20 DIV (data not shown). This system is, to the best of our knowledge, the only one allowing for the reconstruction of 100% oriented neural networks *in vitro* with a robust innervation of the postsynaptic compartment.

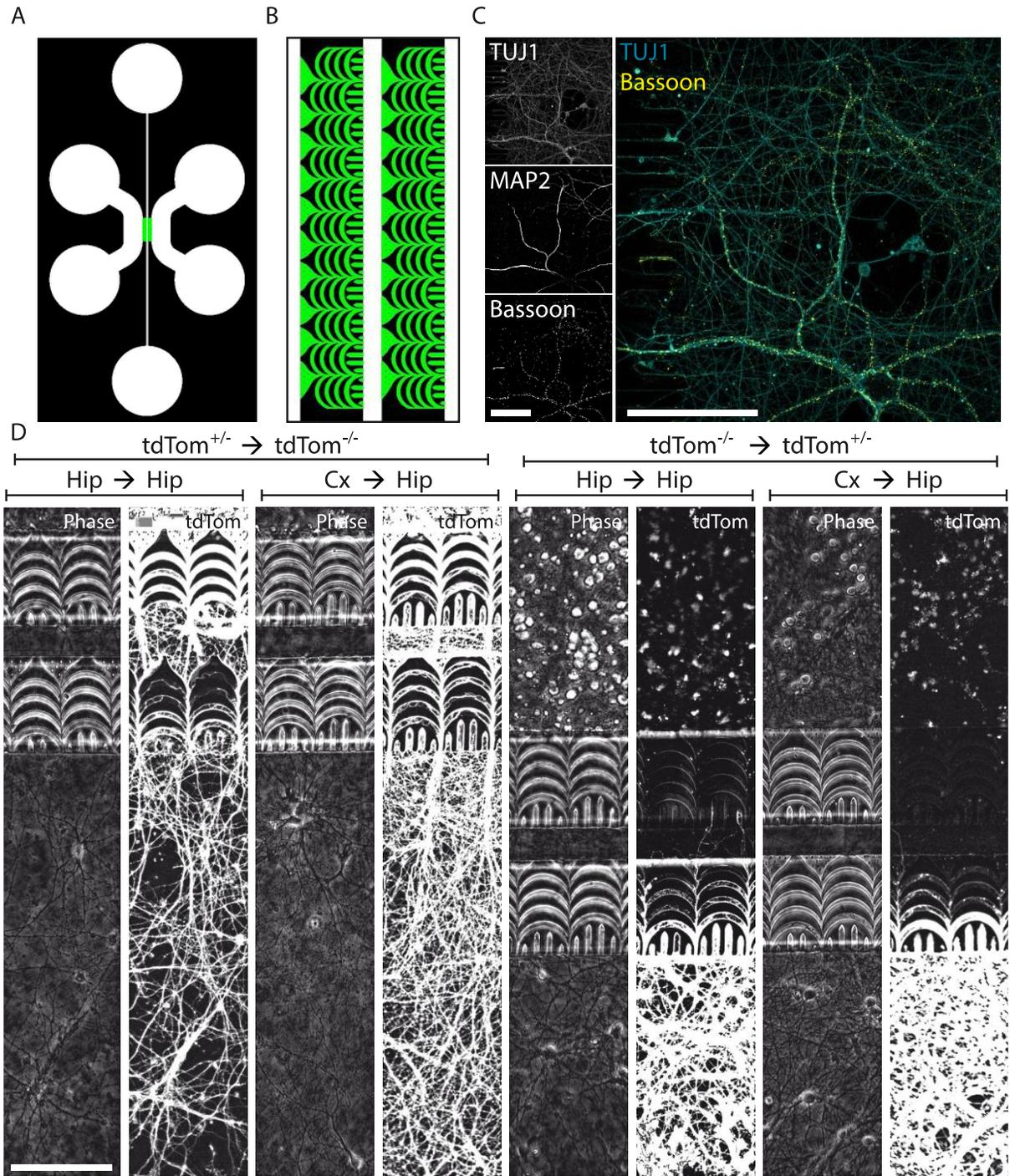


Fig 1 - Reconstruction of fully oriented, synaptically connected neural networks *in vitro*
 (A) Layout of the full chip: in white, 50um high channels. The two large ones are for cell seeding, and the central narrow channels permits improved fluidic isolation and better visualization of the axonal tracts. In green, 3um high microchannels array. (B) Zoom in on the microchannels maze. Arches microchannels selectively filter axons growing from the right side (postsynaptic) while allowing axonal outgrowth from the left side (presynaptic). (C) Synaptically

connected neuron on the postsynaptic side receiving axonal input from the presynaptic side. Cyan: TUJ1; Yellow: Bassoon. Scale bar is 100um. (D) Composite networks with tdTomato (TdTom) expressing neurons in the pre- or postsynaptic compartment for visualization of network connectivity. Hippocampo-hippocampal (Hip-Hip) and cortico-hippocampal (Cx-Hip) networks both demonstrate robust innervation of the postsynaptic side while completely preventing axonal outgrowth to the presynaptic side. Scale bar is 200um.

We evaluated synaptic connectivity maturation over time, as we know from previous experiments (Lassus et al., 2018b) that cortico-striatal networks progressively mature over the first three weeks of culture. Clusters of the presynaptic protein Bassoon in contact with postsynaptic dendrites were present in 13 and 20 DIV cultures (Fig 2A). In order to discriminate synapses originating from the presynaptic populations from synapses formed between neurons of the postsynaptic compartments, we compared synaptic density in devices where the presynaptic compartment had been seeded or not with neurons. As expected, synaptic density increased over time (Fig 2B & 2C). No difference in synaptic density was observed in 13 days old networks, meaning that synaptic connectivity between the pre- and postsynaptic compartment is weak at this time. 20 days old cultures exhibited a higher synaptic density when neurons were seeded in the presynaptic compartment, indicating that synaptic connectivity between the presynaptic and postsynaptic compartment increases over time (Fig 2B & 2C).

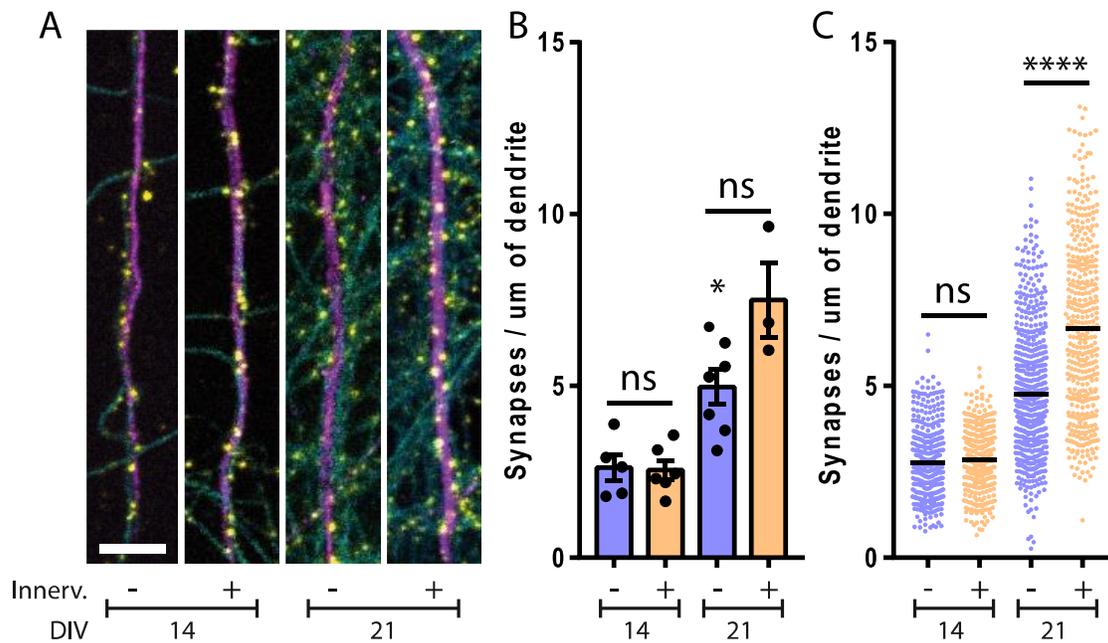


Fig 2 - Progressive maturation of *in vitro* neural networks

Visualization of synaptic density on dendrites of postsynaptic neurons at DIV14 and DIV21 demonstrates innervation-dependent synapses formation with (+) or without (-) the presence of neurons in the presynaptic compartment. (A) Confocal imaging. Cyan: TUJ1; Magenta: MAP2; Yellow: Bassoon. Scale bar is 5 μ m. (B) Quantification of synaptic density in the postsynaptic compartment, individual data points represent replicates. 3 to 7 replicates from 2 individual experiments. Mann-Whitney statistical test. (C) Individual data points represent neurites. 332 to 546 individual neurites. Mann-Whitney statistical test

We thus demonstrated that fully oriented neural networks progressively exhibit increased synaptic connectivity between the postsynaptic and presynaptic compartments. DIV 13 networks will from now on be referred as immature, and DIV 20 as mature.

Dissemination of exogenous aggregates in mature and immature networks

Synaptic connectivity is often assumed to control the spread of aSyn prion-like aggregation in neural networks. However, the role of synaptic structures in mediating interneuronal propagation of seeding aggregates has never been addressed. We sought to take advantage of the progressive maturation of synaptic connectivity of reconstructed networks to assess if synaptic connectivity facilitated the transfer of exogenous fluorescent preformed human aSyn Fibrils (hFib). To this end, we first followed the progressive uptake (Fig 3A) and axonal transport (Fig 3C) of hFib selectively introduced in the presynaptic compartment of reconstructed networks. While we observed an

increased fixation of exogenous aSyn aggregates to mature as compared to immature neurons (Fig 3A & 3B), they were similarly transported to axons located in the central channels (Fig 3C & 3D). This suggests that either internalization or axonal transport mechanisms are saturated in our conditions, or that mature neurons are less efficient in internalizing or transporting hFib.

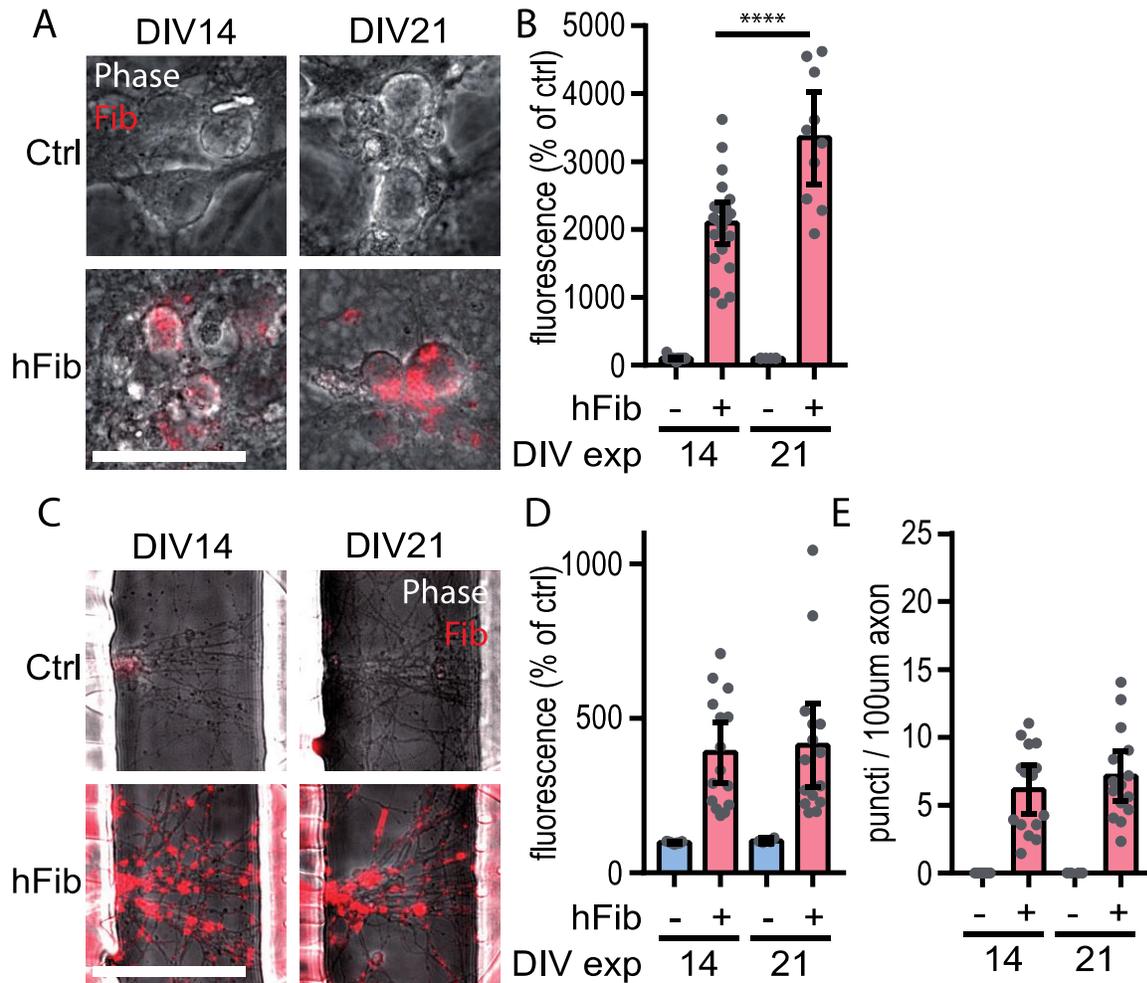


Fig 3 - Direct uptake and anterograde axonal transport of exogenous human aSyn Fibrils (hFib) in mature and immature neural networks

Hip-Hip networks were exposed at DIV14 or DIV21 to 500nM fluorescent hFib for 24h on the presynaptic side, washed, and imaged 2 days later. (A) Fixation of hFib by neuronal somas on the presynaptic side. Grays: Phase; Red: hFib. (B) Quantification of hFib fluorescent signal in somas on the presynaptic side, after normalization to signal in vehicle exposed culture. Mann-Whitney statistical test. (C) Axonal anterograde transport of hFib visualized in the central channel of microfluidic devices. (D) Quantification of hFib fluorescent signal in axons, after normalization to signal in vehicle exposed culture. (E) Number of hFib puncta per 100µm of axon.

We then assessed the transfer of exogenous aggregates to postsynaptic neurons. Fibrils were readily detected in axonal tracts innervating the postsynaptic chambers, and some neurons exhibited an increase in Fibrils-associated fluorescence 3 days after exposure of the presynaptic compartment (Fig 4A). Importantly, fluorescence increase in the postsynaptic neurons was dependent on innervation from the presynaptic compartment, as it was not detected in systems where the presynaptic chamber was left devoid of neurons (Fig 4B). A 12% increase of overall somatic fluorescence signal was detected in postsynaptic neurons of Fibrils exposed immature networks (Fig 4B). Unexpectedly, a lower increase of fluorescence was detected in postsynaptic neurons of mature networks. 9% of postsynaptic neurons were markedly more fluorescent than control neurons in immature networks, whereas 4% of them reached this intensity in mature networks (Fig 4C). As compared to direct exposure to exogenous Fibrils, fluorescence increase in postsynaptic neurons was very modest, suggesting that dissemination of exogenous aggregates is inefficient in the considered timeframe.

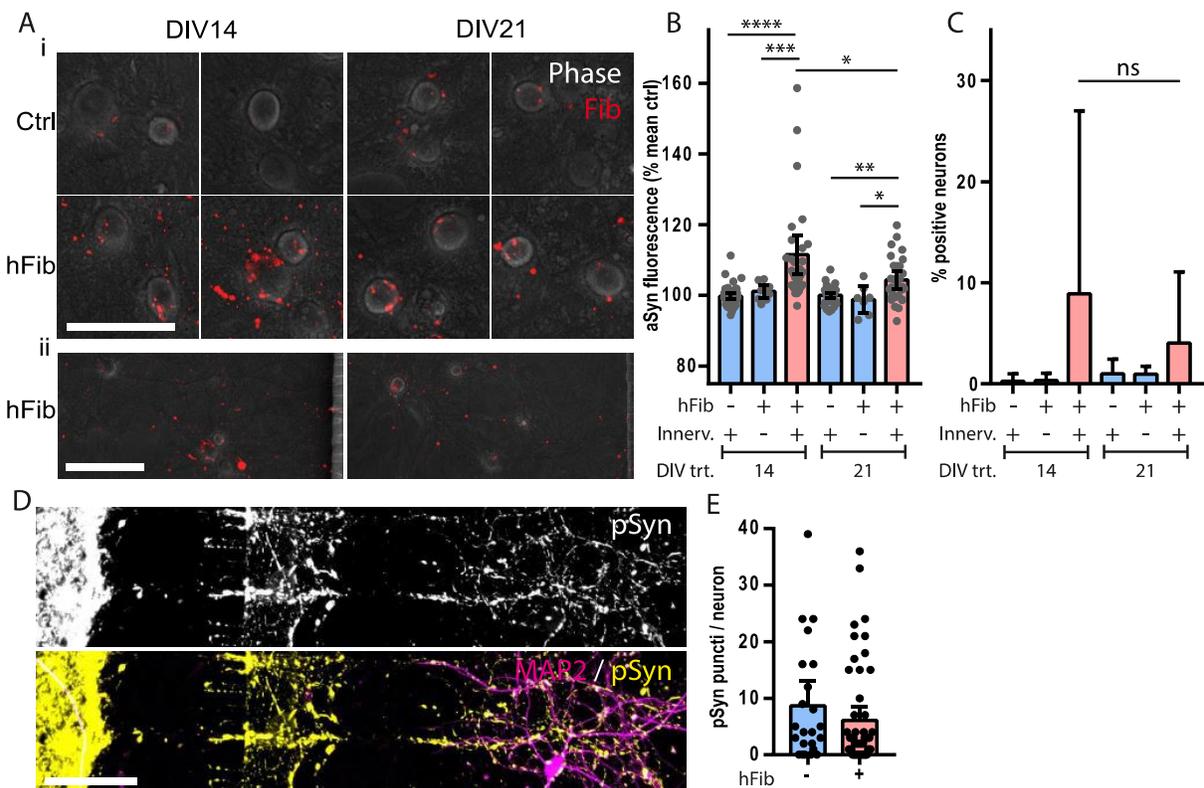


Fig 4 - Innervation dependent hFib dissemination to postsynaptic neurons is more efficient in immature networks, but fails to trigger endogenous aSyn aggregation.

(A) Postsynaptic neurons of Hip-Hip were imaged 3 days after exposure of the presynaptic side to 500nM hFib. Grays: Phase; Red: hFib. (i) Scale bar is 50um. (ii) Scale bar is 100um. (B) Quantification of the mean hFib fluorescent signal in postsynaptic somas. Data points represent 7 to 46 replicates from 2 to 7 individual experiments. Mann-Whitney statistical test. (C) Quantification of the percentage of postsynaptic somas above a threshold fixed at 1.25-fold mean ctrl fluorescent signal. (D) Hip-Hip networks were fixed 10 days after presynaptic exposure to hFib, and reveal abundant pSyn in the postsynaptic compartment. Magenta: MAP2; Yellow: pSyn. Scale bar is 100um. (E) Quantification of pSyn positive puncti in postsynaptic neurons reveal similar signal in vehicle or hFib exposed networks.

Overall, these results suggest that despite a higher synaptic connectivity between the two compartment, a higher fixation of exogenous aggregates to somas and an equivalent transport of aggregates along axonal connections, mature networks are less permissive to inter-neuronal aggregates transfer than immature ones.

We then sought to determine if aggregates that had spread between neurons were able to trigger the aggregation of endogenous aSyn in postsynaptic neurons. To that end, we stained networks 10 days after presynaptic exposure at DIV 13 to hFib with antibodies targeting the serine 129 phosphorylated form of aSyn (pSyn), as well as MAP2 and TUJ1. Presynaptic somas, as well as axons originating from the presynaptic compartment were strongly positive of pSyn aggregates (Fig 4D). However, we were unable to detect any increase in pSyn staining in postsynaptic neurons (Fig 4E).

As hFib have been reported to be slightly less efficient in seeding endogenous aSyn aggregation (Luk et al., 2016), we exposed the presynaptic compartment of reconstructed networks to fluorescent murine aSyn Fibrils (mFib). mFib were readily transferred to postsynaptic neurons through axonal projections (Fig 5A, 5B & 5C). 10 days after exposure, somas in the presynaptic compartment as well as axons originating from presynaptic neurons were strongly positive for pSyn positive inclusions (Fig 5D & 5E). However, pSyn inclusions detected in the postsynaptic compartment were systematically associated with axonal projections, and thus assessing their localization in presynaptic or postsynaptic neuron was hazardous (Fig Supp 1A). Indeed, colocalization of pSyn inclusions with MAP2 was insufficient to infer their postsynaptic nature, as pSyn objects manifestly localized in axons fasciculating with dendrites presented the same

colocalization pattern (Fig Supp 1B i-iii). Somatic pSyn signal in postsynaptic neurons was unchanged between cultures presynaptically exposed to vehicle or to mFib (data not shown).

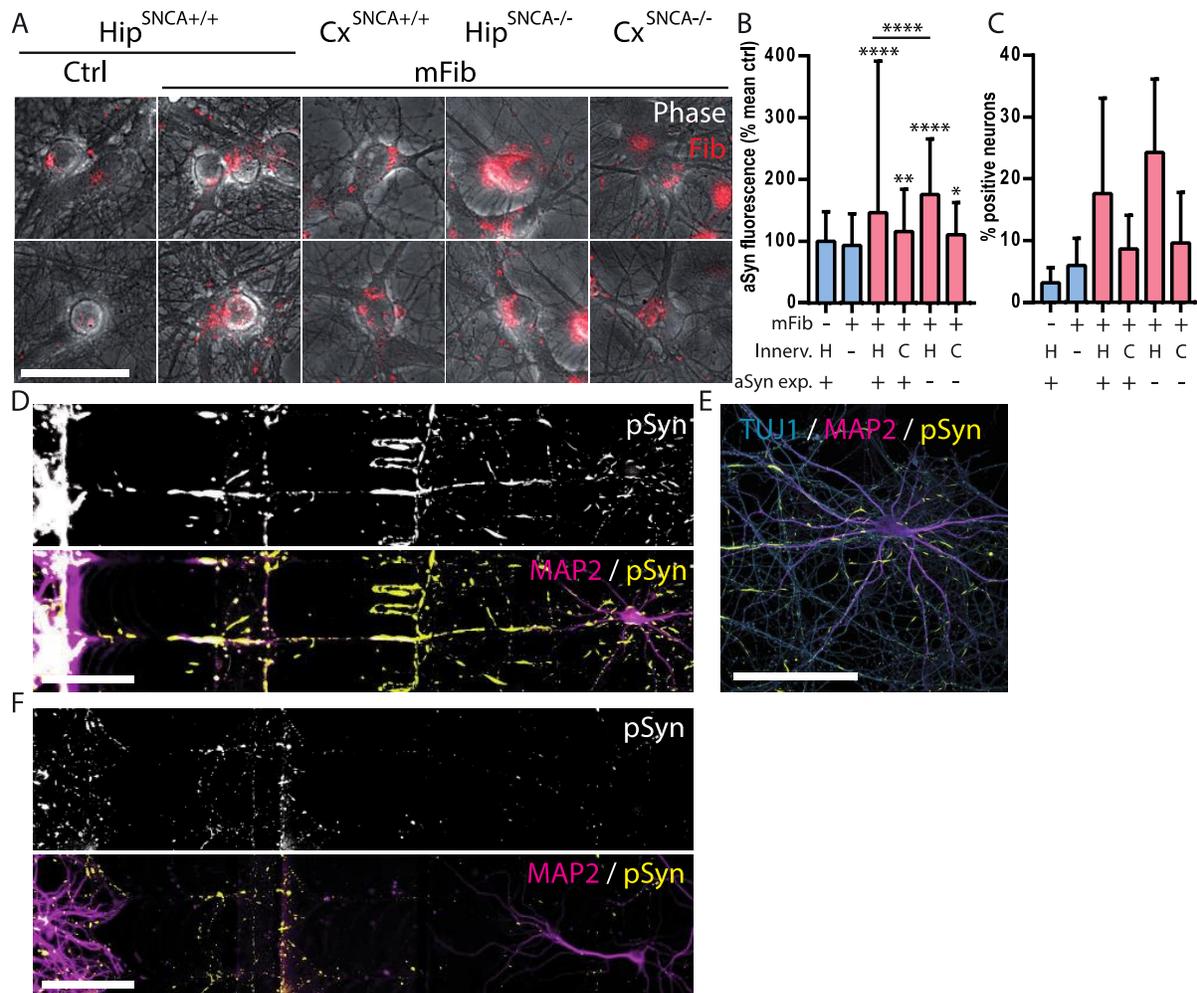


Fig 5 - Innervation dependent murine aSyn Fibrils (mFib) dissemination to postsynaptic neurons is dependent on presynaptic neuronal population but not presynaptic aSyn expression.

(A) Postsynaptic neurons of networks with various presynaptic populations innervating postsynaptic Hip neurons were imaged 1 day after exposure of the presynaptic side to 500nM mFib. Grays: Phase; Red: mFib. Scale bar is 50 μ m. (B) Quantification of the mean mFib fluorescent signal in postsynaptic somas. Data points represent 86 to 871 individual postsynaptic somas from 3 to 15 individual replicates, from 1 to 3 individual experiments. Mann-Whitney statistical test. (C) Quantification of the percentage of postsynaptic somas above a threshold fixed at 2-fold mean ctrl fluorescent signal. (D) Hip^{SNCA+/+}-Hip^{SNCA+/+} neural networks were fixed 10 days after presynaptic exposure to hFib, and reveal abundant pSyn in the postsynaptic compartment. Magenta: MAP2; Yellow: pSyn. (E) Confocal imaging reveal that pSyn positive objects are systematically located in axonal projections. (F) Cx^{SNCA+/+}-Hip^{SNCA+/+} neural

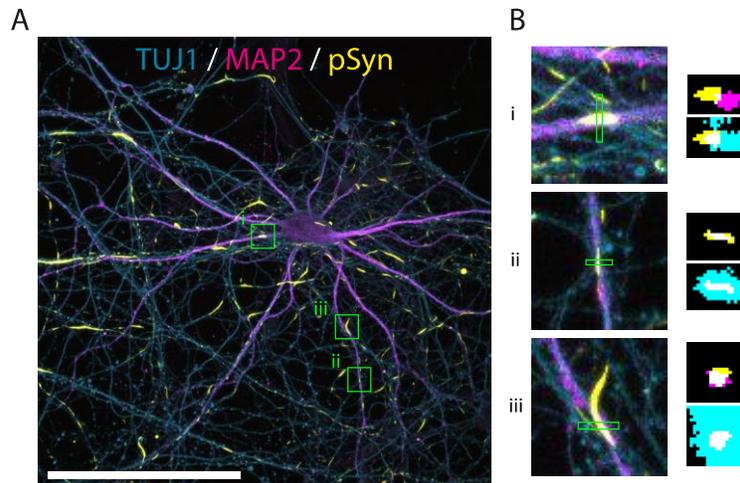
networks were fixed 10 days after presynaptic exposure to hFib. Magenta: MAP2; Yellow: pSyn. Scale bar is 100um in (D, E, F).

We then sought to assess if aggregation could propagate in neural networks whose presynaptic component were made up of different populations, among which cortical neurons from WT mice and hippocampal and cortical neurons from *SNCA*^{-/-} mice. While we previously demonstrated that cortical neurons were less prone to develop intracellular pSyn positive inclusions following exposure to exogenous Fibrils, they send more axons to the postsynaptic compartment than hippocampal neurons and thus might be more efficient in disseminating mFib to postsynaptic neurons. Exposure of immature cortico-hippocampal networks was followed by transfer of exogenous mFib to the postsynaptic neurons (Fig 5A, 5B & 5C). Surprisingly, despite a higher innervation of the postsynaptic compartment, mFib were less efficiently transferred to the postsynaptic neurons in cortico-hippocampal networks as compared to hippocampo-hippocampal networks. It has previously been reported that aSyn aggregation spreading was stronger in an aSyn-null background (Helwig et al., 2016), we thus sought to assess if seeding *SNCA*^{-/-} neurons in the presynaptic compartment would allow for an increase in the dissemination of exogenous mFib. *SNCA*^{-/-} cortical neurons transferred mFib to the postsynaptic neurons with the same efficiency as *SNCA*^{+/+} cortical neurons, while *SNCA*^{-/-} hippocampal neurons were more efficient in this regard than their *SNCA*^{+/+} counterpart. (*Résultats à confirmer, n=3 pour réseaux HipKO-Hip et Cx-Hip, n=5 pour réseaux CxKO-Hip*)

These data suggest that exogenous aggregates transport to postsynaptic neurons is independent of aSyn expression level.

We then assessed the repartition of pSyn inclusions in those different networks 10 days after exposure. pSyn positive inclusions were readily detected in the presynaptic compartment and in axons in the postsynaptic compartments of *SNCA*^{+/+} cortico-hippocampal networks (Fig 5F), but none could be detected in postsynaptic neurons (data not shown).

As aSyn aggregation may unfold in a centripetal fashion in infected neurons (Uchihara 2016), we sought to determine if pSyn inclusions detected in the postsynaptic compartment could actually be set in postsynaptic axons. To do so, we expressed the fluorescent protein GFP selectively in postsynaptic neurons of cortico-hippocampal networks, which allowed for the staining of their whole cytoplasm, including in axons and dendrites. However, pSyn inclusions we observed were systematically excluded from GFP positive processes (data not shown).



Supplementary Figure 1 - Axonal pSyn aggregates are undistinguishable from dendritic pSyn.

Postsynaptic neuron of an Hip-Hip network exposed to mFib on the presynaptic side at DIV13 and fixed 10 days later. (A) Confocal picture. Scale bar is 100um. (B) Zoom on several pSyn objects close to MAP2 positive neurites. On the right, vertical projection of the regions circled in green. (i) and (ii) could well be considered as dendritic aggregates, but (iii) demonstrates that aggregates clearly contained in axons temporarily fasciculating with a dendrite exhibit the same colocalization as (i) and (ii).

Conclusion

Altogether, these data support that original aspects of the propagation of pathological agents can be studied in fully oriented reconstructed neural networks. We found exogenous aggregates dissemination to be more efficient in immature networks. Dissemination efficiency was dependent on the nature of the presynaptic population, but not on presynaptic aSyn expression. However, we failed to detect pSyn inclusions in postsynaptic neurons 10 days after exposure to the presynaptic compartment, suggesting that anterograde propagation of aggregation is a somewhat inefficient process in WT networks in our experimental timeframe.

Discussion

We demonstrated here the anterograde transfer of exogenous aSyn aggregates in reconstructed neural networks made up of murine primary neurons. Although this transfer occurred as soon as 1 day after introduction of exogenous aggregates in the presynaptic compartment (Fig 5A & 5B), it is a relatively inefficient process. Indeed, the hFib-associated fluorescence measured in postsynaptic somas after exposure of the presynaptic compartment was inferior to hFib fluorescence in cultures directly exposed to 200pM of aggregates (data not shown). This means that less than 1/250th of aggregates introduced in the presynaptic compartment found their way to postsynaptic neurons. (*En fait bien moins que 200pM, refaire la courbe-étalon avec des doses plus faibles*)

We sought to assess the impact of synaptic connectivity on exogenous aggregates transfer, assuming that we would find a positive correlation between those two factors. Yet, despite a higher synaptic connectivity between the two compartments, exogenous aggregates spread less efficiently in mature hippocampal networks. Direct fixation of exogenous aggregates in the presynaptic compartment and anterograde axonal transport was higher or equivalent in mature compared to immature networks, suggesting that another factor might impact propagation. It was previously reported that aSyn aggregates could be released to the extracellular medium by unconnected axon terminals following exposure of the somato-dendritic compartment of neuronal cultures in microfluidic devices (Brahic et al., 2016), and that they could be anterogradely transferred to neurons in immature networks *in vitro* (Freundt et al., 2012). Thus, this anterograde transfer of exogenous aggregates in immature networks was not unexpected. However, the reduced efficiency of aggregates dissemination in mature networks raises questions on the often assumed trans-synaptic spread of aggregation. One element that could explain the higher efficiency of this process in immature network is that developing neurons are known to exhibit a high exo- and endocytic activity, and thus might be more prone to release and internalize aSyn aggregates (Tojima and Kamiguchi, 2015). Transposed into the mature human brains in which synucleinopathies are thought to spread through a prion-like process, it might mean that inter-neuronal spreading of

aggregates is linked to other structures than synapses. It might also mean that a subpart of aSyn aggregates interneuronal transfer mechanisms are more active in developing neurons.

The mechanisms underlying a spreading pattern of aggregation not strictly dependent on synaptic connectivity are still unknown (Surmeier et al., 2017). Among those, the efficiency of outward transfer of seeding aggregates from a specific region might impact the final spatial pattern of aSyn inclusions in the CNS. We found out that despite a more robust innervation of the postsynaptic compartment, cortical neurons transferred exogenous aggregates less efficiently than hippocampal neurons. Our results support that the efficiency of transfer of aSyn aggregates might vary from one neuronal population to another, irrespectively of innervation density by axonal projections. Intriguingly, this difference was not linked to aSyn expression, as *SNCA*^{-/-} neurons exhibited a similar efficiency in this regard than *SNCA*^{+/+} ones. This means that regions which are usually devoid of LP and aSyn inclusions detectable with methods such as staining of pSyn might still serve as paths of aggregation spread. This observation might explain discrepancies between the sequential development of inclusions in brain which are weakly connected (Surmeier et al., 2017; Uchihara, 2017), as other intermediate regions which do not develop detectable aggregates might still contain and transfer smaller assemblies. This hypothesis is supported by the recent observation that smaller aggregates are widely present in the CNS, including multiple brain regions that do not usually develop LP in diseased brains (Roberts 2015). It had previously been reported that aSyn aggregates transferred more efficiently in *SNCA*^{-/-} mice CNS as compared to *SNCA*^{+/+} (Helwig et al., 2016). However, the difference the authors observed might have been due to the higher aggregation propensity of human aSyn when expressed on a *SNCA*^{-/-} background than in presence of murine aSyn (Fares et al., 2016).

Despite quick anterograde transfer of exogenous assemblies, we were unable to detect pSyn positive assemblies in postsynaptic neurons. This observation contrasts with what has been previously published in the literature. Indeed, inter-neuronal propagation of aSyn aggregation has been reported in microfluidic devices made up of three compartments serially interconnected with straight microchannels (Tran et al., 2014). In this experimental setup, endogenous aSyn aggregation is detected in neurons in the third compartment as fast as 7 days following introduction of

exogenous aggregates in the third compartment. As no aggregates are detected in the third compartment when no neuron is seeded in the central chamber, authors have interpreted these results as a proof of *in vitro* inter-neuronal propagation of aSyn aggregation (Mao et al., 2016; Tran et al., 2014). Several elements could explain why we did not observe any trace of aggregation in postsynaptic neurons, 10 days after exposure. First, the networks used in the experiments of Tran et al. allow bidirectional axonal growth between the culture chambers. Thus, transfer of aggregation in neural networks could preferentially occur in a retrograde fashion. Second, it could be possible that axons from the third compartment could grow to the first compartment only when neurons are seeded in the intermediate chambers, and would then be able to directly uptake exogenous aggregates and retrogradely transfer them to somas. Indeed, neurons secrete growth factors that improve axonal growth, and to our knowledge the connectivity of these devices has not been studied when all compartments are seeded. Moreover, we observed hippocampal axons reaching 2mm and longer in microfluidic devices developed in our lab. Third, the nature of exogenous aSyn assemblies used in these studies differ from the ones we used. Inter-neuronal spread of aggregation of endogenous aSyn has not been reported *in vitro* or *in vivo* with the aggregates we used (Freundt et al., 2012; Peelaerts et al., 2015; Rey et al., 2013), whereas following similar protocols, the aggregates used in the previously cited studies were able to elicit endogenous aSyn aggregation in distant regions *in vivo* and *in vitro* (Luk et al., 2012a; Rey et al., 2018, 2016; Tran et al., 2014). These observations suggest that the aggregates used in these two series of studies differ in their biological activities, with one being more potent in seeding endogenous aSyn aggregation while not dispersing to other neurons, and the other readily transferring to interconnected neurons while being less potent in generating endogenous aSyn aggregation in distant regions. A systematic comparison of these two aSyn assemblies would be welcomed to reconcile these diverging results.

Overall, our results suggest that the propagation of aSyn aggregation is a slow process. Indeed, synucleinopathies progress over years in the CNS and over months following injection in WT animals. In contrast, endogenous aggregates develop in widespread regions in mutant mice following the same protocol. Thus, we hypothesize that to study *in vitro* interneuronal spread of aggregation, aSyn expression should be increased, or that expression of pathological mutants of aSyn should be triggered to augment susceptibility to seeded aggregation. Alternatively, longer-

lived neuronal cultures such as induced human pluripotent stem cells could allow to study this process on a longer timeframe.

Materials & Methods

Generation of microfluidic culture chips

Master mold, resin mold and chips fabrication have been described in details in (Courte et al., 2018). Briefly, the designs for microchannels and culture compartments were drawn on QCAD. The photo-mask engraved with the designs was ordered from Selba. Photosensitive SU-8 resin (MicroChem) was spincoated on a silicon wafer (Prolog Semicor) and exposed to UV light through the photo-mask using an MJB4 mask aligner (Suss). Unexposed resin was then washed away. These steps were repeated twice, once for microchannels at 3um height and once for culture chambers at 50um height. The resulting mold was used to cast polydimethylsiloxane (PDMS, Ellsworth Adhesives) mixed at a 10:1 mass ratio with curing agent. PDMS was cured 3h minimum at 70°C. The resulting chips were unmoulded, and inlets were punched at the extremities of each compartment. The PDMS blocks were bonded to 130-160um thick glass coverslips (Fisher Scientific) after surface plasma treatment with an Atto plasma generator (Diener). Culture compartments were then immediately filled with deionized water. Culture devices were then placed in Petri dishes for easier handling, and were sterilized under UV light.

Primary neuronal culture

Hippocampal and cortical regions were microdissected from embryos from E16 Swiss (Janvier) or C57bl6/jolahsd (*SNCA*^{-/-}, Envigo) mice, or from C57 female bred with a C57 *tdTomato*^{+/-} male. For distinguishing *tdTomato*^{+/-} from *tdTomato*^{-/-} embryos, a fluorescent light and goggles fitted with the matching filter were used (ref). Microstructures were washed in Gey's Balanced Saline Solution (Sigma) and chemically digested with papain (Sigma) diluted in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermofisher) at 37°C. After digestion was interrupted by adding 10% Foetal Bovine Serum (FBS, GE Healthcare), microstructures were washed. Physical cell

dissociation was then performed by repeatedly flowing microstructures suspended in DMEM containing DNase IV (Sigma). Cell suspension was then centrifuged and washed two times, before being suspended at the desired concentrations. Poly-D-lysine (Sigma) and laminin (Sigma) coated microfluidic devices had their central compartment filled with culture medium: Neurobasal medium (Thermofisher) supplemented with 1% GlutaMAX (Thermofisher), 1% B27 Supplement (Thermofisher) and 10% FBS. This step prevents cells from plugging the microchannels when injecting cell suspension in the culture compartments. 1.5 ul of cells suspended at 40 and 10 million cells / ml were introduced in the presynaptic and postsynaptic compartments, respectively, and were left to adhere for 15 min. Culture medium was added to the culture wells, and water containing 0.5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was added in the Petri dish to limit evaporation. Culture devices were then placed in a humidified atmosphere at 37°C and 5% carbon dioxide. Culture medium was completely replaced, 24h after cell seeding, by FBS-free culture medium. Half of the medium was then replaced every week with fresh medium.

Immunostaining

Cultures were fixed in phosphate buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (Sigma) and 4% sucrose (Sigma). Membrane permeabilization and saturation were performed simultaneously in PBS containing 0.2% Triton X-100 (Sigma) and 1% bovine serum albumin (BSA, Thermofisher). Primary antibodies were incubated 16h at 4°C and secondary antibodies 1h at 21°C. A list of antibodies used in this study can be found in Supplementary Table 1.

Image acquisition

Epifluorescence images acquisition was performed using a XXXX

Confocal images acquisition was performed with a SP5 (Leica) fitted with a 63X NA 1.4 objective.

Synapses analysis

Sequential confocal images were acquired with a 0.42 um step on each field of interest. Neurites were traced from MAP2 images using the Simple Neurite Tracer plugin (Longair et al., 2011) installed on Fiji (Schindelin et al., 2012). Traces were then dilated to 5 um diameter region of

interests (ROIs), and synapses were detected in the resulting ROIs, in the Bassoon image, using the Find Maxima function. The number of Bassoon positive puncta were expressed in function of the length of the neurites traces.

aSyn Fibrils generation

Fibrils made of mouse or human aSyn (mFib and hFib, respectively) were prepared as in (Ghee et al., 2005). A compléter.

Treatment of reconstructed neural network with aSyn Fibrils

Cultures in microfluidic culture chips were exposed to mFib or hFib at DIV13 or 21. Culture medium was completely emptied. Inlets for the postsynaptic compartment were filled with 45ul medium each, inlets of the central compartment with 35ul each, and inlets for the presynaptic compartment were filled with 15 and 10ul of medium containing 500nM of mFib or hFib. Presynaptic compartment was emptied and washed once with fresh medium 24h later, before being filled with 15ul of fresh medium in each well.

Analysis of Fibrils fluorescence in presynaptic and postsynaptic neuronal somas

For analyses involving exogenous fluorescent Fibrils, cultures were acquired live as Fibrils associated fluorescence decreases drastically after fixation. ROIs circling neuronal somas were automatically detected using a modified version of the region-convoluted neural network (R-CNN) described in (He et al., 2017), available at the following URL: https://github.com/matterport/Mask_RCNN. The algorithm was trained over 150 iterations using 4000 ROIs of neuronal somas manually traced in 350 phase pictures. Parameters were adjusted to the size of the desired ROIs. ROIs traced with the R-CNN algorithm were manually validated, then used to sample signal on the corresponding fluorescence image of the same field for further analysis.

Analysis of Fibrils fluorescence in axons

Individual axon tracts were manually traced using the phase picture of fields encompassing the central channel of microfluidic culture devices. Signal was then measured in a 1 μm diameter tract, either using the Find Maxima routine on Fiji, or by measuring the mean fluorescence in the ROI.

Analysis of pSyn load in postsynaptic neurons

Postsynaptic neurons were imaged by confocal microscopy, and pSyn positive puncta in neuronal somas (stained by MAP2 or TUJ1) above a given signal threshold were manually numbered.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney test using Prism 8 (GraphPad).

- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., Braak, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.
- Brahic, M., Bousset, L., Bieri, G., Melki, R., Gitler, A.D., 2016. Axonal transport and secretion of fibrillar forms of α -synuclein, A β 42 peptide and HTTExon 1. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 539–548. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1538-0>
- Courte, J., Renault, R., Jan, A., Viovy, J.-L., Peyrin, J.-M., Villard, C., 2018. Reconstruction of directed neuronal networks in a microfluidic device with asymmetric microchannels. *Methods Cell Biol.* 148, 71–95. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.07.002>
- Danzer, K.M., Ruf, W.P., Putcha, P., Joyner, D., Hashimoto, T., Glabe, C., Hyman, B.T., McLean, P.J., 2011. Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular α -synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *FASEB J.* 25, 326–336. <https://doi.org/10.1096/fj.10-164624>
- Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Alleaume-Butaux, A., Hjorth, J.J., Vignes, M., Schneider, B., Brugg, B., Viovy, J.-L., Peyrin, J.-M., 2013. Synapto-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. *PloS One* 8, e71103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071103>
- Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Doulazmi, M., Brugg, B., Vanhoutte, P., Peyrin, J.-M., 2018. Dysregulated Neurotransmission induces Trans-synaptic degeneration in reconstructed Neuronal Networks. *Sci. Rep.* 8, 11596. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29918-1>
- Deleglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., Vignes, M., Viovy, J.-L., Jacotot, E., Peyrin, J.-M., Brugg, B., 2014. β -amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 145. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0145-3>
- Fares, M.-B., Maco, B., Oueslati, A., Rockenstein, E., Ninkina, N., Buchman, V.L., Masliah, E., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512876113>
- Freundt, E.C., Maynard, N., Clancy, E.K., Roy, S., Bousset, L., Sourigues, Y., Covert, M., Melki, R., Kirkegaard, K., Brahic, M., 2012. Neuron-to-neuron transmission of α -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann. Neurol.* 72, 517–524. <https://doi.org/10.1002/ana.23747>
- Galvin, J.E., Schuck, T.M., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2001. Differential expression and distribution of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in the developing human substantia nigra. *Exp. Neurol.* 168, 347–355. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7615>
- Ghee, M., Melki, R., Michot, N., Mallet, J., 2005. PA700, the regulatory complex of the 26S proteasome, interferes with alpha-synuclein assembly. *FEBS J.* 272, 4023–4033. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04776.x>
- Gladkov, A., Pigareva, Y., Kutyina, D., Kolpakov, V., Bukatin, A., Mukhina, I., Kazantsev, V., Pimashkin, A., 2017. Design of Cultured Neuron Networks in vitro with Predefined Connectivity Using Asymmetric Microfluidic Channels. *Sci. Rep.* 7, 15625. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15506-2>
- Gross, O.P., von Gersdorff, H., 2016. Recycling at synapses. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17692>
- He, K., Gkioxari, G., Dollár, P., Girshick, R., 2017. Mask R-CNN, in: 2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV). Presented at the 2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV), pp. 2980–2988. <https://doi.org/10.1109/ICCV.2017.322>
- Helwig, M., Klinkenberg, M., Rusconi, R., Musgrove, R.E., Majbour, N.K., El-Agnaf, O.M.A., Ulusoy, A., Di Monte, D.A., 2016. Brain propagation of transduced α -synuclein involves non-fibrillar protein species and is enhanced in α -synuclein null mice. *Brain* 139, 856–870. <https://doi.org/10.1093/brain/awv376>
- 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., Kotzbauer, P.T., Miller, T.M., Papy-Garcia, D., Diamond, M.I., 2013. Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3138–3147. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301440110>

- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., 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.
- Lassus, B., Naudé, J., Faure, P., Guedin, D., Von Boxberg, Y., Mannoury la Cour, C., Millan, M.J., Peyrin, J.-M., 2018. Glutamatergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuits probed by dynamic calcium imaging of networks reconstructed in microfluidic chips. *Sci. Rep.* 8, 17461. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35802-9>
- le Feber, J., Postma, W., de Weerd, E., Weusthof, M., Rutten, W.L.C., 2015. Barbed channels enhance unidirectional connectivity between neuronal networks cultured on multi electrode arrays. *Front. Neurosci.* 9, 412. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00412>
- Longair, M.H., Baker, D.A., Armstrong, J.D., 2011. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 2453–2454. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr390>
- 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., Lee, V.M.-Y., 2016. Molecular and Biological Compatibility with Host Alpha-Synuclein Influences Fibril Pathogenicity. *Cell Rep.* 16, 3373–3387. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.053>
- Luk, K.C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2012. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338, 949–953. <https://doi.org/10.1126/science.1227157>
- Luk, K.C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J.R., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908005106>
- Mao, X., Ou, M.T., Karuppagounder, S.S., Kam, T.-I., Yin, X., Xiong, Y., Ge, P., Umanah, G.E., Brahmachari, S., Shin, J.-H., Kang, H.C., Zhang, J., Xu, J., Chen, R., Park, H., Andrabi, S.A., Kang, S.U., Gonçalves, R.A., Liang, Y., Zhang, S., Qi, C., Lam, S., Keiler, J.A., Tyson, J., Kim, D., Panicker, N., Yun, S.P., Workman, C.J., Vignali, D.A.A., Dawson, V.L., Ko, H.S., Dawson, T.M., 2016. Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* 353. <https://doi.org/10.1126/science.aah3374>
- Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D.M.A., Hasegawa, M., 2013. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain net. *Brain J. Neurol.* 136, 1128–1138. <https://doi.org/10.1093/brain/awt037>
- Na, S., Kang, M., Bang, S., Park, D., Kim, J., Sim, S.J., Chang, S., Jeon, N.L., 2016. Microfluidic neural axon diode. *TECHNOLOGY* 04, 240–248. <https://doi.org/10.1142/S2339547816500102>
- Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van den Haute, C., Melki, R., Baekelandt, V., 2015. α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522, 340–344. <https://doi.org/10.1038/nature14547>
- Peyrin, J.-M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., Betuing, S., Pietri, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., Viovy, J.-L., Brugg, B., 2011. Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab. Chip* 11, 3663–3673. <https://doi.org/10.1039/c1lc20014c>
- Renault, R., Durand, J.-B., Viovy, J.-L., Villard, C., 2016. Asymmetric axonal edge guidance: a new paradigm for building oriented neuronal networks. *Lab. Chip* 16, 2188–2191. <https://doi.org/10.1039/c6lc00479b>
- Rey, N.L., George, S., Steiner, J.A., Madaj, Z., Luk, K.C., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Brundin, P., 2018. Spread of aggregates after olfactory bulb injection of α -synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 135, 65–83. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1792-9>
- Rey, N.L., Petit, G.H., Bousset, L., Melki, R., Brundin, P., 2013. Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 555–573. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1160-3>

- Rey, N.L., Steiner, J.A., Maroof, N., Luk, K.C., Madaj, Z., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Brundin, P., 2016. Widespread transneuronal propagation of α -synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *J. Exp. Med.* 213, 1759–1778. <https://doi.org/10.1084/jem.20160368>
- Rietdijk, C.D., Perez-Pardo, P., Garssen, J., van Wezel, R.J.A., Kraneveld, A.D., 2017. Exploring Braak's Hypothesis of Parkinson's Disease. *Front. Neurol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00037>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Shrivastava, A.N., Redeker, V., Fritz, N., Pieri, L., Almeida, L.G., Spolidoro, M., Liebmann, T., Bousset, L., Renner, M., Léna, C., Aperia, A., Melki, R., Triller, A., 2015. α -synuclein assemblies sequester neuronal α 3-Na⁺/K⁺-ATPase and impair Na⁺ gradient. *EMBO J.* 34, 2408–2423. <https://doi.org/10.15252/embj.201591397>
- Surmeier, D.J., Obeso, J.A., Halliday, G.M., 2017. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 101–113. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.178>
- Taylor, A.M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., Jeon, N.L., 2005. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods* 2, 599–605. <https://doi.org/10.1038/nmeth777>
- Tojima, T., Kamiguchi, H., 2015. Exocytic and endocytic membrane trafficking in axon development. *Dev. Growth Differ.* 57, 291–304. <https://doi.org/10.1111/dgd.12218>
- Tran, H.T., Chung, C.H.-Y., Iba, M., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Luk, K.C., Lee, V.M.Y., 2014. α -Synuclein Immunotherapy Blocks Uptake and Templated Propagation of Misfolded α -Synuclein and Neurodegeneration. *Cell Rep.* 7, 2054–2065. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.033>
- Uchihara, T., 2017. An order in Lewy body disorders: Retrograde degeneration in hyperbranching axons as a fundamental structural template accounting for focal/multifocal Lewy body disease. *Neuropathology* 37, 129–149. <https://doi.org/10.1111/neup.12348>
- Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., Patel, T.P., Tanik, S.A., Riddle, D.M., Stieber, A., Meaney, D.F., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2011. Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 72, 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.033>
- Withers, G.S., George, J.M., Banker, G.A., Clayton, D.F., 1997. Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 99, 87–94.
- Wood, S.J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J.C., Citron, M., Biere, A.L., 1999. alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* 274, 19509–19512.

Discussion

Nous avons décrit, dans cette publication, la reconstruction de réseaux de neurones 100% orientés et connectés synaptiquement, ainsi que leur utilisation pour l'étude de la propagation prion-like de l'aSyn. Il s'agit d'une avancée technique importante pour l'étude de la propagation de pathogènes dans des réseaux de neurones reconstruits *in vitro*.

Ce système a permis de mettre en évidence que la propagation interneuronale d'agrégats exogènes d'aSyn était plus efficace dans des réseaux de neurones immatures faiblement connectés synaptiquement que dans des réseaux matures dont les composants sont connectés *via* des synapses. Ce protocole expérimental s'inspirait des résultats obtenus par Lassus et al dans le système "diodes" démontrant une synaptogénèse progressive dans les réseaux *in vitro*. Ce résultat suggère que certains mécanismes de propagation des agrégats exogènes ne dépendent pas de la formation de synapses matures. Le cône de croissance des axones en développement est le siège d'une activité d'endocytose et d'exocytose intense (Tojima and Kamiguchi, 2015). Ainsi, il se pourrait que des mécanismes d'endo- ou d'exocytose particulièrement actifs dans le cône de croissance soient vecteurs de la transmission interneuronale d'agrégats exogènes.

Si la synapse n'est pas nécessaire pour le transfert intercellulaire d'agrégats d'aSyn, quels mécanismes pourraient être impliqués ? Les neurites sont le plus souvent envisagées comme des tubes hermétiques, mais se-peut-il que les portions des neurites non-synaptiques puissent être le siège d'une activité d'exo/endocytose ? Il y aurait-il un intermédiaire cellulaire non-neuronal dans le transfert des agrégats ?

Afin de pouvoir se faire un avis plus solide sur l'importance des structures synaptiques, il serait intéressant de modifier la connectivité synaptique entre les deux populations par d'autres méthodes qu'une différence de maturité. Par exemple, l'expression de certaines protéines peut être modifiée pour impacter la synaptogénèse. Ainsi, il a été reporté qu'une diminution de l'expression de Ngr1 ou de KLHL1 ou une augmentation l'expression de TrKB ou BMP4 pourraient permettre de diminuer la quantité de synapses formées dans des neurones en culture (Higashi et al., 2018; Klau et al., 2001; Perissinotti et al., 2014; Wills et al., 2012). Alternativement, influencer la compétition

entre neurones pour la formation de synapses *via* l'expression de Ephrin-B3 pourrait permettre de modifier la connectivité entre les populations pré- et postsynaptiques sans modifier la quantité totale de synapses (Henderson et al., 2019). Il serait également intéressant de tenter d'induire une toxicité synaptique par d'autres méthodes que celles que j'ai tenté d'employer.

Cependant, la quantité d'agrégats exogènes se disséminant dans les réseaux en sens antérograde est très faible, le signal associé aux hFib se détachant à peine du bruit de fond. Il serait donc peut-être intéressant d'utiliser des agrégats mieux couplés aux fluorophores pour détecter des modifications significatives de l'efficacité de leur transfert.

Les résultats expérimentaux obtenus suggèrent également que la dissémination des agrégats aux neurones postsynaptiques est dépendant de la nature de la population neuronale présynaptique, mais pas de la quantité d'axones émis par la population présynaptique, ni par l'expression de l'aSyn dans celle-ci. En effet, bien que les neurones corticaux émettent plus de prolongements axonaux que les neurones hippocampaux, ils transfèrent moins efficacement les agrégats exogènes. Ces résultats supportent le scénario "en deux phases" de propagation de l'agrégation. Cependant, il se peut que la génération d'inclusions endogènes dans le neurone postsynaptique ne soit pas corrélée à la quantité d'agrégats exogènes transférés. En effet, la quantité et la nature des agrégats générés par le neurone postsynaptique pourrait être des facteurs cruciaux dans la propagation de l'agrégation au neurone postsynaptique. Malheureusement, nous n'avons pu mettre en évidence la présence d'agrégats endogènes dans les neurones postsynaptiques.

Afin d'estimer si l'absence d'inclusions endogènes dans les neurones du deuxième compartiment n'était pas liée à la plus faible quantité de microcanaux dans les systèmes "arches 2.1" comparés aux systèmes "diodes", j'ai reconstruit des réseaux de neurones bidirectionnels grâce à des canaux droits de même densité que les canaux "arches" (Fig 34A). J'ai pu mettre en évidence que des neurones contenant des inclusions d'aSyn étaient détectés seulement dans cette condition, supportant que les axones poussant en sens rétrograde transfèrent très efficacement l'agrégation au neurone, en comparaison au transfert interneuronal rétrograde (Fig 34B). Ces résultats suggèrent que dans des protocoles de propagation de l'agrégation *in vivo*, la présence d'inclusions dans des régions envoyant directement leurs axones vers la zone dans laquelle les agrégats ont été injectés

peut être majoritairement attribuable à l'internalisation directe par les axones des agrégats exogènes et à leur transport rétrograde.

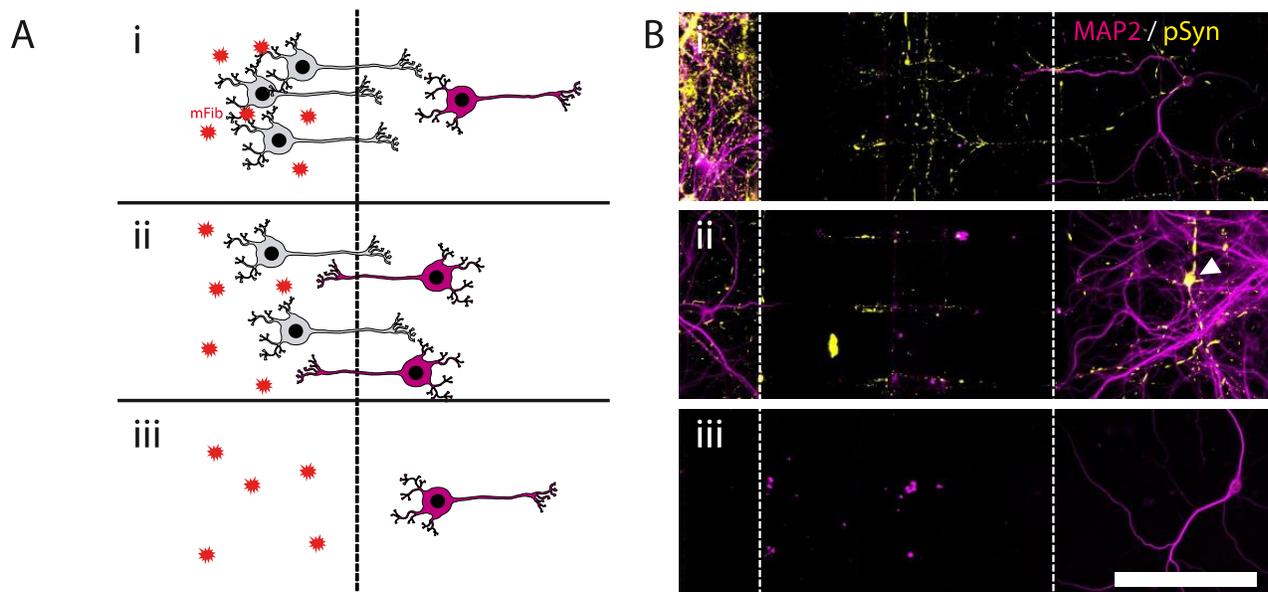


Figure 34 - La propagation de l'agrégation de l'aSyn entre les deux compartiments est dépendante des connexions "rétrogrades"

(A) Représentation schématique des différents systèmes utilisés pour étudier la dépendance aux axones "rétrogrades" de la propagation de l'agrégation. (i) Dans le système "arches 2.1", seuls les neurones du compartiment présynaptique sont en mesure d'émettre des axones vers le compartiment postsynaptique. (ii) Des microcanaux droits permettent la pousse des axones dans les deux directions. (iii) Le système "arches 2.1" dont seul le compartiment postsynaptique estensemencé ne contient pas de connexion axonale entre les deux compartiments. Dans les trois systèmes, 500nM de mFib (rouge) ont été introduits dans le compartiment de gauche. (B) Répartition des agrégats endogènes d'aSyn dans les trois systèmes, 10 jours après exposition. Seul le système ii contient des neurones postsynaptiques positifs pour des inclusions de pSyn. Les pointillés indiquent la localisation des microcanaux. La flèche indique un neurone du compartiment postsynaptique contenant des inclusions pSyn+. Magenta:MAP2 ; Jaune:pSyn. Barre d'échelle : 200um.

Ainsi, nous n'avons pu modéliser que partiellement la propagation de l'agrégation dans des réseaux de neurones 100% orientés *in vitro*. Cependant, d'autres équipes ont détectés, en utilisant un autre système de culture microfluidique (Fig 21), la présence d'inclusions endogènes dans des neurones distants de la zone d'introduction des agrégats exogènes (Mao et al., 2016; Tran et al., 2014). Plusieurs explications pourraient permettre d'expliquer la divergence entre leurs résultats et les nôtres.

Tout d'abord, il se peut que ces systèmes présentent un défaut inhérent. En effet, la cinétique avec laquelle les agrégats sont détectables dans les neurones distants (7 jours) est surprenante au regard de celle observée dans des modèles animaux injectés avec des agrégats exogènes (plusieurs mois) (Rey et al., 2016). Le contrôle habituellement utilisé dans ce modèle composé de trois chambres (Fig 21) pour prouver que la présence d'agrégats dans la population de la chambre 3 est due à un transfert interneuronal est de ne pas ensemercer de neurones dans la chambre centrale. Cette condition est sensée démontrer qu'il n'existe pas de connexion directe entre les chambres 1 et 3. Cependant, il se peut que celles-ci soient seulement présentes quand des neurones sont ensemençés dans la chambre 2. En effet, de nombreux facteurs de croissance sécrétés par les neurones peuvent influencer la pousse axonale, et il se peut que la connectivité entre les chambres 1 et 3 ne soit possible que quand des neurones sont présents dans la chambre 2. Qui plus est, mes propres expériences ont mis en évidence ce phénomène, des axones corticaux et hippocampaux poussant sur au moins 2 mm dans de telles conditions (Fig 31). Cette longueur est suffisante pour relier les chambres 1 et 3. Il est donc possible que la propagation de l'agrégation de la chambre 1 à 3 observée dans ces systèmes corresponde en réalité à l'internalisation directe des agrégats introduits dans la chambre 1 par les axones de la chambre 3 l'ayant atteinte, ce qui expliquerait la rapidité avec laquelle des inclusions se développent dans les neurones postsynaptiques. Afin d'étudier cette possibilité, il serait intéressant d'ensemencer des neurones fluorescents dans la chambre 3, et des neurones WT dans les deux autres, et d'observer si les axones fluorescents atteignent ou non la chambre 1.

Une autre hypothèse est que la propagation se fasse majoritairement *via* les connexions rétrogrades dans ces systèmes contenant des microcanaux droits n'orientant pas la pousse axonale. J'ai donc cherché à étudier la propagation rétrograde de l'agrégation. Pour cela, j'ai exposé des axones neurones poussant dans des systèmes microfluidiques à un mélange d'agrégats d'aSyn fluorescents et de traceurs neuronaux rétrogrades (Retrobeads, Lumafluor). J'ai quantifié 3 jours plus tard le signal fluorescent associé aux agrégats exogènes dans les neurones contenant ou non des Retrobeads. La présence d'agrégats dans les neurones ne contenant pas de Retrobeads aurait mis en évidence un transfert rétrograde efficace. Cependant, je n'ai pas observé un transfert rétrograde

efficace dans cette direction (Figure 35). La présence ou non d'inclusions d'aSyn endogènes dans ces deux populations de neurones est en cours d'estimation.

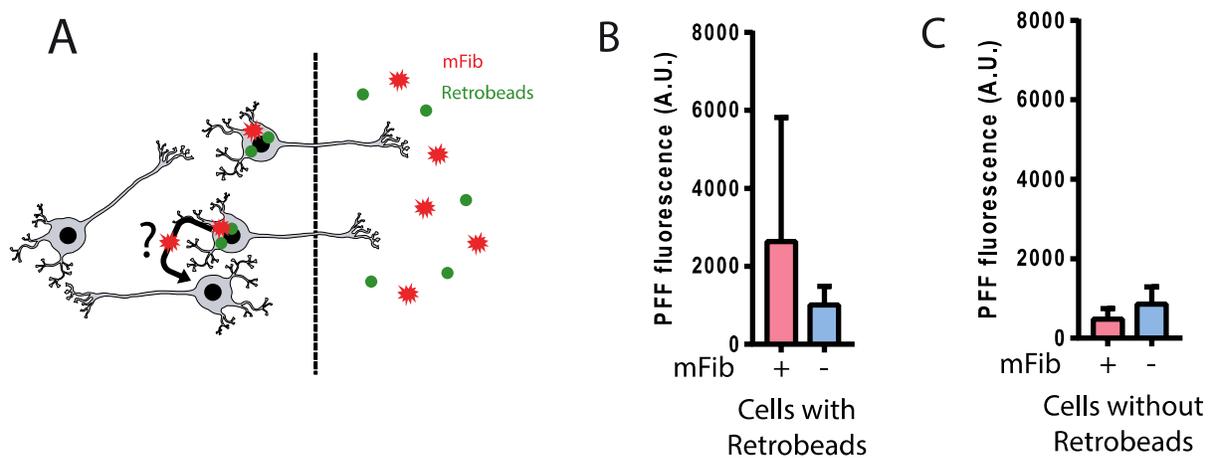


Figure 35 - Absence de dissémination rétrograde efficace des agrégats exogènes.

(A) Représentation schématique du système expérimental. Des neurones (gris) peuvent émettre leurs prolongements axonaux à travers des microcanaux (isolation fluide représentée par la ligne en pointillée), et un mélange de mFib fluorescentes (rouge) et de marqueurs rétrogrades (Retrobeads, vert) sont introduits dans la chambre axonale. La présence de mFib dans des neurones ne contenant pas de Retrobeads suggèrerait alors un transfert interneuronal rétrograde. (B) Signal fluorescent associé aux mFib dans les neurones contenant des Retrobeads. (C) Signal fluorescent associé aux mFib dans les neurones ne contenant pas de Retrobeads.

Une dernière hypothèse tient à la nature des agrégats utilisés dans notre étude et dans ces autres études. En effet, les études de la propagation de l'aSyn dans les réseaux de neurones peuvent se faire selon deux modalités principales : le suivi des agrégats exogènes, ou le suivi des agrégats endogènes se formant par nucléation. En étudiant la littérature, on peut remarquer un clivage entre les observations faites par les auteurs selon le type d'agrégats utilisé. Ainsi, les auteurs collaborant avec l'équipe de Ronald Melki notent un transfert des agrégats initiaux de cellule à cellule (Freundt et al., 2012; Rey et al., 2013), mais n'ont pas publié de résultats supportant l'agrégation de l'aSyn endogène dans les neurones récepteurs. Cependant, d'autres équipes utilisant des agrégats distincts ne notent pas de transfert des agrégats initiaux, mais observent une propagation de l'agrégation de l'aSyn endogène (Mao et al., 2016; Rey et al., 2016; Tran et al., 2014). Il se pourrait donc que les agrégats générés par ces deux équipes diffèrent dans leur activité biologique.

Discussion

Les mécanismes fondamentaux de propagation prion-like de l'aSyn dans les réseaux de neurones restent encore mal compris. Au niveau moléculaire, plusieurs mécanismes candidats ont été proposés. Les agrégats d'aSyn pourraient être transmis de neurone à neurone *via* une sécrétion directe dans le milieu extracellulaire, ou en association avec des exosomes, ou bien encore *via* des connections cytoplasmiques directes de type TNT. Il n'est pas encore clair lesquels de ces mécanismes sont pertinents dans le cerveau des patients, ni même dans les réseaux de neurones. Au niveau cellulaire, le rôle des connections synaptiques reste encore spéculatif. Enfin, au niveau du réseau de neurone, il n'est pas encore clair quels sont les paramètres à la base du développement de patrons d'agrégation tels que celui décrit par le staging de Braak, qui ne dépendent pas ou peu de la connectivité entre les différentes régions touchées (Surmeier et al., 2017).

Plusieurs méthodes expérimentales permettent d'aborder ces questions. *In vivo*, l'injection d'agrégats exogènes d'aSyn dans le cerveau de souris est suivi du développement d'agrégats d'aSyn endogène dans des régions distantes (Luk et al., 2012a), et ce système a permis de mettre en évidence que le site d'injection modifiait les régions dans lesquelles l'agrégation se développe, supportant que celle-ci se propage en suivant les connections neuroanatomiques (Masuda-Suzukake et al., 2014; Rey et al., 2016). Cependant, le chemin emprunté par l'agrégation pour se propager dans les réseaux de neurones ne peut pas être inféré à partir de ces données, les régions cérébrales étant liées par de nombreuses connections directes et indirectes. Qui plus est, il est difficile dans ces modèles d'estimer l'impact de facteurs propres au neurone "émetteur" de l'agrégation ou au neurone "récepteur" de l'agrégation. *In vitro*, les méthodes classiques de culture en puit permettent d'élucider certains mécanismes moléculaires importants pour ce phénomène, tels que les mécanismes de sécrétion ou les récepteurs extracellulaires des agrégats. Cependant, ces systèmes ne permettent pas d'étudier l'importance de ces facteurs dans le cadre d'une propagation interneuronale. En effet, il se peut que les mécanismes identifiés dans des cultures non structurées ne soient pas valables dans le cadre d'un réseau de neurone physiologique.

A mi-chemin entre ces deux approches, la reconstruction de réseaux de neurones *in vitro* combine les avantages de l'*in vitro* à l'imitation des caractéristiques physiologiques des réseaux de neurones. Ces systèmes permettent d'interfacer synaptiquement des populations neuronales choisies, dont le fond génétique peut être changé à volonté, et pouvant être modifiées séparément. La plupart des systèmes existants au début de ma thèse ne correspondaient pas aux caractéristiques nécessaires à l'étude des phénomènes prion-like. J'ai donc développé un nouveau système permettant de reconstruire des réseaux de neurones 100% orientés, qui m'a permis de poser de nouvelles questions quant à la propagation prion-like de l'aSyn qui n'avaient pu être abordées précédemment.

J'ai donc souhaité aborder au cours de ma thèse les mécanismes pouvant être à la base du développement d'un patron d'agrégation ne corrélant pas avec la connectivité synaptique entre les régions.

Tout d'abord, j'ai évalué si des populations neuronales distinctes développaient la même quantité d'agrégats endogènes quand elles étaient exposées à la même quantité d'agrégats exogènes. J'ai pu mettre en évidence que différentes populations de neurones mises en culture fixaient les agrégats exogènes d'une façon similaire, mais divergeaient fortement dans la quantité d'inclusions endogènes qu'ils développaient. J'ai pu mettre en évidence que cette différence de vulnérabilité reposait sur le niveau d'expression endogène de l'aSyn. Ce résultat était suggéré par plusieurs publications précédentes, mais aucune n'avait mis en évidence un effet-dose entre niveau d'expression de l'aSyn et quantité d'inclusions (Erskine et al., 2018; Luna et al., 2018; Taguchi et al., 2014). Ainsi, l'expression endogène de l'aSyn serait un des facteurs influençant le patron de propagation de l'agrégation dans les réseaux de neurones.

J'ai ensuite cherché à reconstruire des réseaux de neurones *in vitro* pour y modéliser la propagation prion-like de l'aSyn, comme plusieurs équipes l'ayant précédemment publié (Freundt et al., 2012; Tran et al., 2014). J'ai utilisé un système précédemment développé dans l'équipe, permettant de reconstruire des réseaux de neurones avec une orientation des connexions aux alentours de 95%, c'est à dire que les axones reliant les deux compartiments de culture poussent majoritairement dans une direction. En utilisant ce système, je souhaitais modéliser la propagation antérograde de l'agrégation. J'ai pu montrer que les agrégats exogènes se propageaient avec la même efficacité

dans trois types de réseau, quel que soit la nature de la population pré- et postsynaptique. Cependant, je me suis ensuite aperçu que les connections poussant en sens rétrogrades étaient responsables de la majeure partie de la propagation que j'observais.

J'ai donc développé un nouveau système de reconstruction de réseaux de neurones *in vitro* basé sur une forme de microcanaux de type "arches". J'ai réussi pour la première fois à reconstruire des réseaux de neurones connectés synaptiquement et orientés à 100%, c'est à dire sans axone poussant en sens rétrograde. J'ai donc cherché à modéliser la propagation de l'agrégation de l'aSyn dans ce système, pour aborder deux paramètres pouvant impacter ce phénomène : les connections synaptiques, et la nature de la population présynaptique. En effet, l'impact des connections synaptiques sur la propagation est mal connu, et un passage purement synaptique ou non synaptique de l'agrégation aurait de grandes conséquences sur les mécanismes moléculaires de transfert vraisemblables. L'impact de la population présynaptique sur la propagation permettrait d'aborder deux questions distinctes : l'impact de la nature moléculaire de la synapse, qui diffère selon la paire de neurones interconnectés, et l'impact de l'expression de l'aSyn sur la propagation. Comme évoqué précédemment, ce dernier point permettrait de trancher entre deux visions de la propagation prion-like dans les réseaux de neurones : le scénario "domino-like" et "en deux phases".

Les résultats obtenus dans ce système supportent que les structures synaptiques ne soient pas nécessaires pour la dissémination des agrégats exogènes. Ils supportent également que la dissémination des agrégats exogènes est dépendante de la nature de la population présynaptique, mais pas de l'expression de l'aSyn. Ainsi, ces résultats supportent une propagation "en deux phases", et indiquent que différentes populations neuronales transfèrent avec une efficacité distincte les agrégats d'aSyn.

Cependant, nous n'avons pu observer d'agrégats endogènes dans les neurones postsynaptiques, en opposition avec plusieurs résultats dans la littérature, ce qui pourrait être dû à des défauts dans le système utilisé dans les autres études. Ainsi, si propagation de l'agrégation il y a, ce phénomène semble se dérouler sur des durées dépassant celles sur laquelle des cultures primaires murines en réseau peuvent être maintenues. Il serait très intéressant de pouvoir observer la génération d'agrégats endogènes dans les neurones postsynaptiques, et pour cela plusieurs axes d'amélioration

de la méthode expérimentale sont possibles. Une première façon serait d'augmenter la vulnérabilité des neurones postsynaptiques à l'agrégation induite par le seeding. Pour cela, le niveau d'expression de l'aSyn pourrait être augmenté par un vecteur viral, ou bien les neurones postsynaptiques pourraient être disséqués à partir de souris surexprimant l'aSyn ou exprimant une forme mutante de la protéine particulièrement sensible à l'agrégation. Une autre façon d'augmenter les chances d'observer ce transfert d'agrégation pourrait être d'utiliser des cultures neuronales survivant sur le plus long terme, comme par exemple des cultures de neurones de rat, ou des cultures de cellules souches neuronales humaines. Cependant, les essais de culture de cellules souches menés dans les systèmes "arches 2.1" ont été peu concluants, les axones humains se fragmentant peu de temps après avoir traversé les microcanaux. Cette dégénérescence pourrait être attribuée à la plus grande largeur des axones humains, qui seraient alors contraints dans les passages très étroits du système "arches 2.1". Des modifications de la forme des microcanaux sont envisageables pour les rendre compatibles avec l'utilisation de neurones humains. Il se pourrait également que des perturbations de l'homéostasie synaptique améliorent la propagation de l'agrégation. Des expériences dans ce but ont été réalisées dans l'équipe il y a peu, et sont en attente d'analyse.

Les résultats expérimentaux que j'ai obtenus suggèrent également une approche expérimentale *in vivo* pour évaluer l'importance du poids synaptique dans la propagation. Si la différence de vulnérabilité est contrôlée en grande partie par le niveau d'expression de l'aSyn, et que cette différence de vulnérabilité "dissimule" l'impact des synapses, alors égaliser l'expression de l'aSyn dans les différentes régions du cerveau pourrait permettre d'évaluer l'impact des poids synaptiques. Cette égalisation pourrait par exemple se faire via l'expression sous le contrôle d'un promoteur pan-neuronal de l'aSyn, sur un fond génétique KO pour l'aSyn. La propagation de l'agrégation suivant l'injection intracérébrale de PFFs pourrait alors permettre d'interroger les facteurs de vulnérabilité distincts de l'expression de l'aSyn, dont la connectivité synaptique au site d'injection.

En conclusion, mes résultats supportent que l'absence de corrélation entre poids synaptiques et patron de propagation ne remette pas en cause l'hypothèse prion-like. Ils suggèrent que la vulnérabilité intrinsèque des populations neuronales joue un rôle majeur dans la mise en place de ce patron d'agrégation, mais que des agrégats seedants pourraient se propager à travers des populations peu vulnérables, dans un scénario que j'ai dénommé "en deux phases". Ainsi, de

nombreux paramètres influencent sans aucun doute la propagation de l'agrégation entre les très nombreuses paires de types neuronaux présentes dans le SNC. La reconstruction de réseaux de neurones orientés *in vitro* est une approche prometteuse pour aborder ces questions, mais des améliorations pourraient être apportées au système expérimental que j'ai développé.

Bibliographie

- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., Rosenthal, A., 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239–252.
- Abounit, Saïda, Bousset, L., Loria, F., Zhu, S., de Chaumont, F., Pieri, L., Olivo-Marin, J.-C., Melki, R., Zurzolo, C., 2016. Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J.* 35, 2120–2138. <https://doi.org/10.15252/embj.201593411>
- Abounit, Saïda, Wu, J.W., Duff, K., Victoria, G.S., Zurzolo, C., 2016. Tunneling nanotubes: A possible highway in the spreading of tau and other prion-like proteins in neurodegenerative diseases. *Prion* 10, 344–351. <https://doi.org/10.1080/19336896.2016.1223003>
- Acuña-Hinrichsen, F., Muñoz, M., Hott, M., Martin, C., Mancilla, E., Salazar, P., Leyton, L., Zambrano, A., Concha, M.I., Burgos, P.V., Otth, C., 2019. Herpes Simplex Virus Type 1 Enhances Expression of the Synaptic Protein Arc for Its Own Benefit. *Front. Cell. Neurosci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00505>
- Adler, C.H., Beach, T.G., 2016. Neuropathological basis of nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 31, 1114–1119. <https://doi.org/10.1002/mds.26605>
- Aguzzi, A., Altmeyer, M., 2016. Phase Separation: Linking Cellular Compartmentalization to Disease. *Trends Cell Biol.* 26, 547–558. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.03.004>
- Aguzzi, A., Heikenwalder, M., Polymenidou, M., 2007. Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 552–561. <https://doi.org/10.1038/nrm2204>
- Ahn, B.-H., Rhim, H., Kim, S.Y., Sung, Y.-M., Lee, M.-Y., Choi, J.-Y., Wolozin, B., Chang, J.-S., Lee, Y.H., Kwon, T.K., Chung, K.C., Yoon, S.-H., Hahn, S.J., Kim, M.-S., Jo, Y.-H., Min, D.S., 2002. alpha-Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 12334–12342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110414200>
- Albers, J., Offenhäusser, A., 2016. Signal Propagation between Neuronal Populations Controlled by Micropatterning. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00046>
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., Clarke, M.C., 1967. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764–766. <https://doi.org/10.1038/214764a0>
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Schapira, A.H., Gardiner, C., Sargent, I.L., Wood, M.J.A., Cooper, J.M., 2011. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* 42, 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.029>
- Anderson, J.P., Walker, D.E., Goldstein, J.M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R.J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P.S., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M.G., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S., Gai, W.P., Chilcote, T.J., 2006. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J. Biol. Chem.* 281, 29739–29752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600933200>
- Angot, E., Steiner, J.A., Lema Tomé, C.M., Ekström, P., Mattsson, B., Björklund, A., Brundin, P., 2012. Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *PloS One* 7, e39465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039465>
- Anunciado, D., Rai, D.K., Qian, S., Urban, V., O'Neill, H., 2015. Small-angle neutron scattering reveals the assembly of alpha-synuclein in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1854, 1881–1889. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.08.009>
- Anwar, S., Peters, O., Millership, S., Ninkina, N., Doig, N., Connor-Robson, N., Threlfell, S., Kooner, G., Deacon, R.M., Bannerman, D.M., Bolam, J.P., Chandra, S.S., Cragg, S.J., Wade-Martins, R., Buchman, V.L., 2011. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 7264–7274. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6194-10.2011>
- Arai, Y., Yamazaki, M., Mori, O., Muramatsu, H., Asano, G., Katayama, Y., 2001. Alpha-synuclein-positive structures in cases with sporadic Alzheimer's disease: morphology and its relationship to tau aggregation. *Brain Res.* 888, 287–296. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03082-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03082-1)
- Arawaka, S., Saito, Y., Murayama, S., Mori, H., 1998. Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 is immunoreactive for alpha-synuclein. *Neurology* 51, 887–889. <https://doi.org/10.1212/wnl.51.3.887>

- Arima, K., Hirai, S., Sunohara, N., Aoto, K., Izumiyama, Y., Uéda, K., Ikeda, K., Kawai, M., 1999. Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res.* 843, 53–61. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01848-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01848-x)
- Ashley, J., Cordy, B., Lucia, D., Fradkin, L.G., Budnik, V., Thomson, T., 2018. Retrovirus-like Gag Protein Arc1 Binds RNA and Traffics across Synaptic Boutons. *Cell* 172, 262–274.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.022>
- Astbury, W.T., Dickinson, S., Bailey, K., 1935. The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *Biochem. J.* 29, 2351–2360.1. <https://doi.org/10.1042/bj0292351>
- Atarashi, R., Moore, R.A., Sim, V.L., Hughson, A.G., Dorward, D.W., Onwubiko, H.A., Priola, S.A., Caughey, B., 2007. Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat. Methods* 4, 645–650. <https://doi.org/10.1038/nmeth1066>
- Atarashi, R., Wilham, J.M., Christensen, L., Hughson, A.G., Moore, R.A., Johnson, L.M., Onwubiko, H.A., Priola, S.A., Caughey, B., 2008. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat. Methods* 5, 211–212. <https://doi.org/10.1038/nmeth0308-211>
- Attens, J., Jellinger, K.A., 2008. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34, 466–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00937.x>
- Auer, S., Dobson, C.M., Vendruscolo, M., Maritan, A., 2008. Self-Templated Nucleation in Peptide and Protein Aggregation. *Phys. Rev. Lett.* 101, 258101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.101.258101>
- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P.H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 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.
- Bae, E.-J., Lee, H.-J., Rockenstein, E., Ho, D.-H., Park, E.-B., Yang, N.-Y., Desplats, P., Masliah, E., Lee, S.-J., 2012. Antibody-aided clearance of extracellular α -synuclein prevents cell-to-cell aggregate transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 13454–13469. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1292-12.2012>
- Baltazar, M.T., Dinis-Oliveira, R.J., de Lourdes Bastos, M., Tsatsakis, A.M., Duarte, J.A., Carvalho, F., 2014. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—a mechanistic approach. *Toxicol. Lett.* 230, 85–103. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.039>
- Bandopadhyay, R., Kingsbury, A.E., Muqit, M.M., Harvey, K., Reid, A.R., Kilford, L., Engelender, S., Schlossmacher, M.G., Wood, N.W., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Lees, A.J., 2005. Synphilin-1 and parkin show overlapping expression patterns in human brain and form aggresomes in response to proteasomal inhibition. *Neurobiol. Dis.* 20, 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.03.021>
- Bänziger, C., Soldini, D., Schütt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., Basler, K., 2006. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125, 509–522. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.049>
- Barrenschée, M., Zorenkov, D., Böttner, M., Lange, C., Cossais, F., Scharf, A.B., Deuschl, G., Schneider, S.A., Ellrichmann, M., Fritscher-Ravens, A., Wedel, T., 2017. Distinct pattern of enteric phospho-alpha-synuclein aggregates and gene expression profiles in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 1. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0408-2>
- Bartels, T., Choi, J.G., Selkoe, D.J., 2011. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477, 107–110. <https://doi.org/10.1038/nature10324>
- Bartscherer, K., Pelte, N., Ingelfinger, D., Boutros, M., 2006. Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125, 523–533. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.009>
- Bassett, D.S., Bullmore, E.T., 2017. Small-World Brain Networks Revisited. *The Neuroscientist* 23, 499–516. <https://doi.org/10.1177/1073858416667720>
- 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., Walker, D.G., Arizona Parkinson's Disease Consortium, 2010. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 689–702. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0664-3>
- Beach, T.G., White, C.L., Hladik, C.L., Sabbagh, M.N., Connor, D.J., Shill, H.A., Sue, L.I., Sasse, J., Bachalakuri, J., Henry-Watson, J., Akiyama, H., Adler, C.H., Arizona Parkinson's Disease Consortium, 2009. Olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 117, 169–174. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0450-7>

- Beck, E., Daniel, P.M., 1969. Degenerative diseases of the central nervous system transmissible to experimental animals. *Postgrad. Med. J.* 45, 361–370. <https://doi.org/10.1136/pgmj.45.524.361>
- Bekkers, J.M., Stevens, C.F., 1991. Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7834–7838. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7834>
- Benabid, A.L., Pollak, P., Louveau, A., Henry, S., de Rougemont, J., 1987. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl. Neurophysiol.* 50, 344–346.
- Béringue, V., Andréoletti, O., Le Dur, A., Essalmani, R., Vilotte, J.-L., Lacroux, C., Reine, F., Herzog, L., Biacabé, A.-G., Baron, T., Caramelli, M., Casalone, C., Laude, H., 2007. A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 6965–6971. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0693-07.2007>
- Béringue, V., Herzog, L., Reine, F., Le Dur, A., Casalone, C., Vilotte, J.-L., Laude, H., 2008. Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1898–1901. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080941>
- Bertini, I., Calderone, V., Fragai, M., Giachetti, A., Loconte, M., Luchinat, C., Maletta, M., Nativi, C., Yeo, K.J., 2007. Exploring the subtleties of drug-receptor interactions: the case of matrix metalloproteinases. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2466–2475. <https://doi.org/10.1021/ja065156z>
- Bertler, A., Rosengren, E., 1959. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 15, 10–11. <https://doi.org/10.1007/bf02157069>
- Bessen, R.A., 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., Marsh, R.F., 1992. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 2), 329–334. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-2-329>
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T., 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson’s disease. *Nat. Neurosci.* 3, 1301–1306. <https://doi.org/10.1038/81834>
- Bétemps, D., Verchère, J., Brot, S., Morignat, E., Bousset, L., Gaillard, D., Lakhdar, L., Melki, R., 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. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-29>
- Binolfi, A., Theillet, F.-X., Selenko, P., 2012. Bacterial in-cell NMR of human α -synuclein: a disordered monomer by nature? *Biochem. Soc. Trans.* 40, 950–954. <https://doi.org/10.1042/BST20120096>
- Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., 1961. [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien. Klin. Wochenschr.* 73, 787–788.
- Biol, M., Wojcik, S.P., Miranker, A.D., Rhoades, E., 2019. Identification of N-linked glycans as specific mediators of neuronal uptake of acetylated α -Synuclein. *PLoS Biol.* 17, e3000318. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000318>
- Bjorklund, G., Stejskal, V., Urbina, M.A., Dadar, M., Chirumbolo, S., Mutter, J., 2018. Metals and Parkinson’s Disease: Mechanisms and Biochemical Processes. *Curr. Med. Chem.* 25, 2198–2214. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171129124616>
- Black, M.M., Lasek, R.J., 1980. Slow components of axonal transport: two cytoskeletal networks. *J. Cell Biol.* 86, 616–623. <https://doi.org/10.1083/jcb.86.2.616>
- Blanpied, T.A., Scott, D.B., Ehlers, M.D., 2002. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* 36, 435–449.
- Boassa, D., Berlanga, M.L., Yang, M.A., Terada, M., Hu, J., Bushong, E.A., Hwang, M., Masliah, E., George, J.M., Ellisman, M.H., 2013. Mapping the subcellular distribution of α -synuclein in neurons using genetically encoded probes for correlated light and electron microscopy: implications for Parkinson’s disease pathogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 2605–2615. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2898-12.2013>
- Bolton, D.C., McKinley, M.P., Prusiner, S.B., 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309–1311. <https://doi.org/10.1126/science.6815801>
- Bonifati, V., 2007. LRRK2 low-penetrance mutations (Gly2019Ser) and risk alleles (Gly2385Arg)-linking familial and sporadic Parkinson’s disease. *Neurochem. Res.* 32, 1700–1708. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9324-y>

- Booth, A.M., Fang, Y., Fallon, J.K., Yang, J.-M., Hildreth, J.E.K., Gould, S.J., 2006. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J. Cell Biol.* 172, 923–935. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508014>
- Booth, R., Kim, H., 2012. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB). *Lab. Chip* 12, 1784–1792. <https://doi.org/10.1039/c2lc40094d>
- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Böckmann, A., Meier, B.H., Melki, R., 2013a. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* 4, 2575. <https://doi.org/10.1038/ncomms3575>
- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Böckmann, A., Meier, B.H., Melki, R., 2013b. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3575>
- Boxberg, Y.V., 1988. Protein analysis on two-dimensional polyacrylamide gels in the femtogram range: use of a new sulfur-labeling reagent. *Anal. Biochem.* 169, 372–375.
- Braak, H., de Vos, R.A.I., Bohl, J., Del Tredici, K., 2006. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* 396, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.012>
- Braak, H., Del Tredici, K., 2008. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70, 1916–1925. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000312279.49272.9f>
- Braak, Heiko, Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., Braak, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., Del Tredici, K., 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 318, 121–134. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>
- Braak, H., Rüb, U., Gai, W.P., Del Tredici, K., 2003. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 110, 517–536. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2>
- Brahic, M., Bousset, L., Bieri, G., Melki, R., Gitler, A.D., 2016. Axonal transport and secretion of fibrillar forms of α -synuclein, A β 2 peptide and HTTExon 1. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 539–548. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1538-0>
- Braungart, E., Gerlach, M., Riederer, P., Baumeister, R., Hoener, M.C., 2004. Caenorhabditis elegans MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neurodegener. Dis.* 1, 175–183. <https://doi.org/10.1159/000080983>
- Brenowitz, W.D., Keene, C.D., Hawes, S.E., Hubbard, R.A., Longstreth, W.T., Woltjer, R.L., Crane, P.K., Larson, E.B., Kukull, W.A., 2017. Alzheimer's disease neuropathologic change, Lewy body disease, and vascular brain injury in clinic- and community-based samples. *Neurobiol. Aging* 53, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.01.017>
- Brown, K.L., Stewart, K., Ritchie, D.L., Mabbott, N.A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W.I., Bruce, M.E., 1999. Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat. Med.* 5, 1308–1312. <https://doi.org/10.1038/15264>
- Bruce, M., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G., Fraser, H., 1994. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 343, 405–411. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0036>
- Bruce, M.E., 1993. Scrapie strain variation and mutation. *Br. Med. Bull.* 49, 822–838. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072649>
- Brundin, P., Li, J.-Y., Holton, J.L., Lindvall, O., Revesz, T., 2008. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 741–745. <https://doi.org/10.1038/nrn2477>
- Brundin, P., Melki, R., 2017. Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 9808–9818. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1788-16.2017>
- Brundin, P., Melki, R., Kopito, R., 2010. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 301–307. <https://doi.org/10.1038/nrm2873>
- Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C., 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339–1347. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90360-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90360-3)

- Büeler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A., Weissmann, C., 1994. High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol. Med. Camb. Mass* 1, 19–30.
- Bungeroth, M., Appenzeller, S., Regulin, A., Völker, W., Lorenzen, I., Grötzing, J., Pendziwiat, M., Kuhlenbäumer, G., 2014. Differential aggregation properties of alpha-synuclein isoforms. *Neurobiol. Aging* 35, 1913–1919. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.009>
- Burré, J., Sharma, M., Südhof, T.C., 2018. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024091>
- Burré, J., Sharma, M., Südhof, T.C., 2015. Definition of a molecular pathway mediating α -synuclein neurotoxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 5221–5232. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4650-14.2015>
- Burré, J., Sharma, M., Südhof, T.C., 2014. α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E4274–E4283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416598111>
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., Südhof, T.C., 2010. α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science* 329, 1663–1667. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>
- Burré, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A.T., Südhof, T.C., 2013. Properties of native brain α -synuclein. *Nature* 498, E4-6; discussion E6-7. <https://doi.org/10.1038/nature12125>
- Buyukmihci, N., Goehring-Harmon, F., Marsh, R.F., 1983. Neural pathogenesis of experimental scrapie after intraocular inoculation of hamsters. *Exp. Neurol.* 81, 396–406. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(83\)90271-6](https://doi.org/10.1016/0014-4886(83)90271-6)
- Cabin, D.E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N.B., Gottschalk, W., McIlwain, K.L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C.E., Paylor, R., Lu, B., Nussbaum, R.L., 2002. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 8797–8807.
- Calafate, S., Buist, A., Miskiewicz, K., Vijayan, V., Daneels, G., de Strooper, B., de Wit, J., Verstreken, P., Moechars, D., 2015. Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation. *Cell Rep.* 11, 1176–1183. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.043>
- Cali, T., Ottolini, D., Negro, A., Brini, M., 2012. α -Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *J. Biol. Chem.* 287, 17914–17929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302794>
- Canerina-Amaro, A., Pereda, D., Diaz, M., Rodriguez-Barreto, D., Casañas-Sánchez, V., Heffer, M., Garcia-Esparcia, P., Ferrer, I., Puertas-Avendaño, R., Marin, R., 2019. Differential Aggregation and Phosphorylation of Alpha Synuclein in Membrane Compartments Associated With Parkinson Disease. *Front. Neurosci.* 13, 382. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00382>
- Cappai, R., Leck, S.-L., Tew, D.J., Williamson, N.A., Smith, D.P., Galatis, D., Sharples, R.A., Curtain, C.C., Ali, F.E., Cherny, R.A., Culvenor, J.G., Bottomley, S.P., Masters, C.L., Barnham, K.J., Hill, A.F., 2005. Dopamine promotes alpha-synuclein aggregation into SDS-resistant soluble oligomers via a distinct folding pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 1377–1379. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3437fje>
- Card, J.P., 1998. Exploring brain circuitry with neurotropic viruses: new horizons in neuroanatomy. *Anat. Rec.* 253, 176–185. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199812\)253:6<176::AID-AR6>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199812)253:6<176::AID-AR6>3.0.CO;2-W)
- Carlsson, A., 1993. Thirty years of dopamine research. *Adv. Neurol.* 60, 1–10.
- Carlsson, A., 1971. Basic concepts underlying recent developments in the field of Parkinson's disease. *Contemp. Neurol. Ser.* 8, 1–31.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., Waldeck, B., 1958. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127, 471. <https://doi.org/10.1126/science.127.3296.471>
- Carrel, A., 1923. A METHOD FOR THE PHYSIOLOGICAL STUDY OF TISSUES IN VITRO. *J. Exp. Med.* 38, 407–418. <https://doi.org/10.1084/jem.38.4.407>
- Carrel, A., Burrows, M.T., 1910. CULTIVATION OF ADULT TISSUES AND ORGANS OUTSIDE OF THE BODY. *J. Am. Med. Assoc.* 55, 1379–1381. <https://doi.org/10.1001/jama.1910.04330160047018>
- Casaccia-Bonnel, P., Kascsak, R.J., Fersko, R., Callahan, S., Carp, R.I., 1993. Brain regional distribution of prion protein PrP27-30 in mice stereotaxically microinjected with different strains of scrapie. *J. Infect. Dis.* 167, 7–12. <https://doi.org/10.1093/infdis/167.1.7>

- Castilla, J., Saá, P., Hetz, C., Soto, C., 2005. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.011>
- Castilla, J., Saá, P., Morales, R., Abid, K., Maundrell, K., Soto, C., 2006. Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol.* 412, 3–21. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)12001-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)12001-7)
- Castle, M.J., Perlson, E., Holzbaaur, E.L., Wolfe, J.H., 2014. Long-distance Axonal Transport of AAV9 Is Driven by Dynein and Kinesin-2 and Is Trafficked in a Highly Motile Rab7-positive Compartment. *Mol. Ther.* 22, 554–566. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.237>
- Caughey, B., Lansbury, P.T., 2003. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 267–298. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.010302.081142>
- Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F., Caughey, W.S., 1991. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 7672–7680. <https://doi.org/10.1021/bi00245a003>
- Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H.-B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., Hammer, R.E., Battaglia, G., German, D.C., Castillo, P.E., Südhof, T.C., 2004. Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14966–14971. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406283101>
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O.M., Südhof, T.C., 2005. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.028>
- Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., Destée, A., 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet Lond. Engl.* 364, 1167–1169. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1)
- Chauveau, A., Aucher, A., Eissmann, P., Vivier, E., Davis, D.M., 2010. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5545–5550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910074107>
- Chen, L., Feany, M.B., 2005. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* 8, 657–663. <https://doi.org/10.1038/nn1443>
- Chen, L., Periquet, M., Wang, X., Negro, A., McLean, P.J., Hyman, B.T., Feany, M.B., 2009. Tyrosine and serine phosphorylation of alpha-synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation. *J. Clin. Invest.* 119, 3257–3265. <https://doi.org/10.1172/JCI39088>
- Cherny, D., Hoyer, W., Subramaniam, V., Jovin, T.M., 2004. Double-stranded DNA stimulates the fibrillation of alpha-synuclein in vitro and is associated with the mature fibrils: an electron microscopy study. *J. Mol. Biol.* 344, 929–938. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.096>
- Chiti, F., Dobson, C.M., 2017. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 27–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045115>
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., Dobson, C.M., 1999. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3590–3594. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3590>
- Chivet, M., Javalet, C., Laulagnier, K., Blot, B., Hemming, F.J., Sadoul, R., 2014. Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J. Extracell. Vesicles* 3, 24722. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24722>
- Choi, J.-K., Cali, I., Surewicz, K., Kong, Q., Gambetti, P., Surewicz, W.K., 2016. Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 13851–13856. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610716113>
- Chu, Y., Kordower, J.H., 2010. Lewy body pathology in fetal grafts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1184, 55–67. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05229.x>
- Chung, S.J., Kim, J., Lee, H.J., Ryu, H.-S., Kim, K., Lee, J.H., Jung, K.W., Kim, M.J., Kim, M.-J., Kim, Y.J., Yun, S.-C., Lee, J.-Y., Hong, S.-M., Myung, S.-J., 2016. Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: Limited role as a biomarker. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 31, 241–249. <https://doi.org/10.1002/mds.26473>

- Chutna, O., Gonçalves, S., Villar-Piqué, A., Guerreiro, P., Marijanovic, Z., Mendes, T., Ramalho, J., Emmanouilidou, E., Ventura, S., Klucken, J., Barral, D.C., Giorgini, F., Vekrellis, K., Outeiro, T.F., 2014. The small GTPase Rab11 co-localizes with α -synuclein in intracellular inclusions and modulates its aggregation, secretion and toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 23, 6732–6745. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu391>
- Claverol-Tinturé, E., Cabestany, J., Rosell, X., 2007. Multisite recording of extracellular potentials produced by microchannel-confined neurons in-vitro. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 54, 331–335. <https://doi.org/10.1109/TBME.2006.880903>
- Claverol-Tinturé, E., Ghirardi, M., Fiumara, F., Rosell, X., Cabestany, J., 2005. Multielectrode arrays with elastomeric microstructured overlays for extracellular recordings from patterned neurons. *J. Neural Eng.* 2, L1-7. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/2/2/L01>
- Cohen, A.S., Calkins, E., 1959. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183, 1202–1203. <https://doi.org/10.1038/1831202a0>
- Cole, G., Neal, J.W., 1990. The brain in aged elephants. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49, 190–192. <https://doi.org/10.1097/00005072-199003000-00012>
- Collinge, J., 2016. Mammalian prions and their wider relevance in neurodegenerative diseases. *Nature* 539, 217–226. <https://doi.org/10.1038/nature20415>
- Collinge, J., Clarke, A.R., 2007. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 318, 930–936. <https://doi.org/10.1126/science.1138718>
- Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., Hill, A.F., 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of “new variant” CJD. *Nature* 383, 685–690. <https://doi.org/10.1038/383685a0>
- Collinge, J., Whitfield, J., McKintosh, E., Beck, J., Mead, S., Thomas, D.J., Alpers, M.P., 2006. Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet Lond. Engl.* 367, 2068–2074. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68930-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68930-7)
- Collins, S.R., Douglass, A., Vale, R.D., Weissman, J.S., 2004. Mechanism of prion propagation: amyloid growth occurs by monomer addition. *PLoS Biol.* 2, e321. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020321>
- Come, J.H., Fraser, P.E., Lansbury, P.T., 1993. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5959–5963. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.5959>
- Condomitti, G., de Wit, J., 2018. Heparan Sulfate Proteoglycans as Emerging Players in Synaptic Specificity. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00014>
- Conway, K.A., Harper, J.D., Lansbury, P.T., 1998. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* 4, 1318–1320. <https://doi.org/10.1038/3311>
- Conway, K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C., Ding, T.T., Williamson, R.E., Lansbury, P.T., 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson’s disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 571–576. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.571>
- Cookson, M.R., 2016. Cellular functions of LRRK2 implicate vesicular trafficking pathways in Parkinson’s disease. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1603–1610. <https://doi.org/10.1042/BST20160228>
- Cookson, M.R., Hardy, J., Lewis, P.A., 2008. Genetic neuropathology of Parkinson’s disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 1, 217–231.
- Cooney, J.R., Hurlburt, J.L., Selig, D.K., Harris, K.M., Fiala, J.C., 2002. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 2215–2224.
- Cooper, A.A., Gitler, A.D., Cashikar, A., Haynes, C.M., Hill, K.J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K.E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Marsischky, G., Kolodner, R.D., Labaer, J., Rochet, J.-C., Bonini, N.M., Lindquist, S., 2006. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson’s models. *Science* 313, 324–328. <https://doi.org/10.1126/science.1129462>
- Costanzo, M., Abounit, S., Marzo, L., Danckaert, A., Chamoun, Z., Roux, P., Zurzolo, C., 2013. Transfer of polyglutamine aggregates in neuronal cells occurs in tunneling nanotubes. *J. Cell Sci.* 126, 3678–3685. <https://doi.org/10.1242/jcs.126086>
- Cotzias, G.C., Van Woert, M.H., Schiffer, L.M., 1967. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N. Engl. J. Med.* 276, 374–379. <https://doi.org/10.1056/NEJM196702162760703>

- Courte, J., Renault, R., Jan, A., Viovy, J.-L., Peyrin, J.-M., Villard, C., 2018. Reconstruction of directed neuronal networks in a microfluidic device with asymmetric microchannels. *Methods Cell Biol.* 148, 71–95. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.07.002>
- Creed, R.B., Goldberg, M.S., 2018. Analysis of α -Synuclein Pathology in PINK1 Knockout Rat Brains. *Front. Neurosci.* 12, 1034. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01034>
- Crews, L., Tsigelny, I., Hashimoto, M., Masliah, E., 2009. Role of Synucleins in Alzheimer's Disease. *Neurotox. Res.* 16, 306–317. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9073-6>
- Crick, F., 1970. Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561–563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>
- Crozet, C., Lezmi, S., Flamant, F., Samarut, J., Baron, T., Bencsik, A., 2007. Peripheral circulation of the prion infectious agent in transgenic mice expressing the ovine prion protein gene in neurons only. *J. Infect. Dis.* 195, 997–1006. <https://doi.org/10.1086/512085>
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., Sulzer, D., 2004. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1101738>
- Cuillé, J., Chelle, P., 1936. La tremblante du mouton est bien inoculable. *Comptes Rendus Séances Académie Sci.* 78–79.
- Cykowski, M.D., Coon, E.A., Powell, S.Z., Jenkins, S.M., Benarroch, E.E., Low, P.A., Schmeichel, A.M., Parisi, J.E., 2015. Expanding the spectrum of neuronal pathology in multiple system atrophy. *Brain J. Neurol.* 138, 2293–2309. <https://doi.org/10.1093/brain/awv114>
- Dahlstroem, A., Fuxe, K., Olson, L., Ungerstedt, U., 1964. ASCENDING SYSTEMS OF CATECHOLAMINE NEURONS FROM THE LOWER BRAIN STEM. *Acta Physiol. Scand.* 62, 485–486. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1964.tb10446.x>
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., Kostka, M., 2007. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9220–9232. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2617-07.2007>
- Danzer, K.M., Kranich, L.R., Ruf, W.P., Cagsal-Getkin, O., Winslow, A.R., Zhu, L., Vanderburg, C.R., McLean, P.J., 2012. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol. Neurodegener.* 7, 42. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-42>
- Danzer, K.M., Ruf, W.P., Putchá, P., Joyner, D., Hashimoto, T., Glabe, C., Hyman, B.T., McLean, P.J., 2011. Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular α -synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *FASEB J.* 25, 326–336. <https://doi.org/10.1096/fj.10-164624>
- de Lau, L.M.L., Breteler, M.M.B., 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5, 525–535. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9)
- De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S., Miller, C.C.J., 2008. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 151–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711>
- Deleault, N.R., Geoghegan, J.C., Nishina, K., Kacsak, R., Williamson, R.A., Supattapone, S., 2005. Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J. Biol. Chem.* 280, 26873–26879. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503973200>
- Deleault, N.R., Harris, B.T., Rees, J.R., Supattapone, S., 2007. Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9741–9746. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702662104>
- Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Alleaume-Butaux, A., Hjorth, J.J., Vignes, M., Schneider, B., Brugg, B., Viovy, J.-L., Peyrin, J.-M., 2013. Synapto-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. *PloS One* 8, e71103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071103>
- Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Doulazmi, M., Brugg, B., Vanhoutte, P., Peyrin, J.-M., 2018. Dysregulated Neurotransmission induces Trans-synaptic degeneration in reconstructed Neuronal Networks. *Sci. Rep.* 8, 11596. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29918-1>
- Deleglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., Vignes, M., Viovy, J.-L., Jacotot, E., Peyrin, J.-M., Brugg, B., 2014. β -amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 145. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0145-3>
- Delenclos, M., Trendafilova, T., Mahesh, D., Baine, A.M., Moussaud, S., Yan, I.K., Patel, T., McLean, P.J., 2017. Investigation of Endocytic Pathways for the Internalization of Exosome-Associated Oligomeric Alpha-Synuclein. *Front. Neurosci.* 11, 172. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00172>

- Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M.J., Jakobson, E., de Groot, C., Geuze, H.J., 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 165, 1259–1265. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.3.1259>
- Desplats, P., Lee, H.-J., Bae, E.-J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903691106>
- Desplats, P., Spencer, B., Crews, L., Pathel, P., Morvinski-Friedmann, D., Kosberg, K., Roberts, S., Patrick, C., Winner, B., Winkler, J., Masliah, E., 2012. α -Synuclein induces alterations in adult neurogenesis in Parkinson disease models via p53-mediated repression of Notch1. *J. Biol. Chem.* 287, 31691–31702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.354522>
- Dettmer, U., Newman, A.J., Luth, E.S., Bartels, T., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.403311>
- Dettmer, U., Newman, A.J., Soldner, F., Luth, E.S., Kim, N.C., von Saucken, V.E., Sanderson, J.B., Jaenisch, R., Bartels, T., Selkoe, D., 2015. Parkinson-causing α -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. *Nat. Commun.* 6, 7314. <https://doi.org/10.1038/ncomms8314>
- DeWitt, D.C., Rhoades, E., 2013. α -Synuclein can inhibit SNARE-mediated vesicle fusion through direct interactions with lipid bilayers. *Biochemistry* 52, 2385–2387. <https://doi.org/10.1021/bi4002369>
- Dhillon, J.-K.S., Trejo-Lopez, J.A., Riffe, C., Levites, Y., Sacino, A.N., Borchelt, D.R., Yachnis, A.Y., Giasson, B.I., 2019. Comparative analyses of the in vivo induction and transmission of α -synuclein pathology in transgenic mice by MSA brain lysate and recombinant α -synuclein fibrils. *Acta Neuropathol. Commun.* 7. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0733-3>
- Diao, J., Burré, J., Vivona, S., Cipriano, D.J., Sharma, M., Kyoung, M., Südhof, T.C., Brunger, A.T., 2013. Native α -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *eLife* 2, e00592. <https://doi.org/10.7554/eLife.00592>
- Diener, T.O., McKinley, M.P., Prusiner, S.B., 1982. Viroids and prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 5220–5224. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.17.5220>
- Ding, T.T., Lee, S.-J., Rochet, J.-C., Lansbury, P.T., 2002. Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry* 41, 10209–10217. <https://doi.org/10.1021/bi020139h>
- Ding, X., Ma, M., Teng, J., Teng, R.K.F., Zhou, S., Yin, J., Fonkem, E., Huang, J.H., Wu, E., Wang, X., 2015. Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. *Oncotarget* 6, 24178–24191. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4680>
- Dobson, C.M., 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24, 329–332.
- Dominy, S.S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L.J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M.I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., Hasturk, H., Walker, G.D., Reynolds, E.C., Faull, R.L.M., Curtis, M.A., Dragunow, M., Potempa, J., 2019. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci. Adv.* 5, eaau3333. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>
- Donaldson, D.S., Kobayashi, A., Ohno, H., Yagita, H., Williams, I.R., Mabbott, N.A., 2012. M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol.* 5, 216–225. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.68>
- Donaldson, D.S., Sehgal, A., Rios, D., Williams, I.R., Mabbott, N.A., 2016. Increased Abundance of M Cells in the Gut Epithelium Dramatically Enhances Oral Prion Disease Susceptibility. *PLoS Pathog.* 12, e1006075. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006075>
- Du, T.-T., Wang, L., Duan, C.-L., Lu, L.-L., Zhang, J.-L., Gao, G., Qiu, X.-B., Wang, X.-M., Yang, H., 2015. GBA deficiency promotes SNCA/ α -synuclein accumulation through autophagic inhibition by inactivated PPP2A. *Autophagy* 11, 1803–1820. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1086055>
- Duffy, P.E., 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. <https://doi.org/10.1097/00005072-196507000-00003>

- Dufty, B.M., Warner, L.R., Hou, S.T., Jiang, S.X., Gomez-Isla, T., Leenhouts, K.M., Oxford, J.T., Feany, M.B., Masliah, E., Rohn, T.T., 2007. Calpain-cleavage of alpha-synuclein: connecting proteolytic processing to disease-linked aggregation. *Am. J. Pathol.* 170, 1725–1738. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061232>
- Eanes, E.D., Glenner, G.G., 1968. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 16, 673–677. <https://doi.org/10.1177/16.11.673>
- Ehringer, H., 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. <https://doi.org/10.1007/bf01485901>
- Eisenberg, D., Jucker, M., 2012. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 148, 1188–1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>
- El-Agnaf, O.M.A., Salem, S.A., Paleologou, K.E., Cooper, L.J., Fullwood, N.J., Gibson, M.J., Curran, M.D., Court, J.A., Mann, D.M.A., Ikeda, S., Cookson, M.R., Hardy, J., Allsop, D., 2003. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 1945–1947. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0098fje>
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., Browne, G., 2001. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* 307, 1061–1073. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4538>
- Ellis, C.E., Murphy, E.J., Mitchell, D.C., Golovko, M.Y., Scaglia, F., Barceló-Coblijn, G.C., Nussbaum, R.L., 2005. Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10190–10201. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.22.10190-10201.2005>
- Ellis, C.E., Schwartzberg, P.L., Grider, T.L., Fink, D.W., Nussbaum, R.L., 2001. alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 276, 3879–3884. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010316200>
- Emanuele, M., Chierigatti, E., 2015. Mechanisms of alpha-synuclein action on neurotransmission: cell-autonomous and non-cell autonomous role. *Biomolecules* 5, 865–892. <https://doi.org/10.3390/biom5020865>
- Emmanouilidou, E., Elenis, D., Papasilekas, T., Stranjalis, G., Gerozissis, K., Ioannou, P.C., Vekrellis, K., 2011. Assessment of α -synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma. *PLoS One* 6, e22225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022225>
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L., Vekrellis, K., 2010. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 6838–6851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010>
- Emmanouilidou, E., Minakaki, G., Keramioti, M.V., Xylaki, M., Balafas, E., Chrysanthou-Piterou, M., Kloukina, I., Vekrellis, K., 2016. GABA transmission via ATP-dependent K⁺ channels regulates α -synuclein secretion in mouse striatum. *Brain J. Neurol.* 139, 871–890. <https://doi.org/10.1093/brain/awv403>
- Erskine, D., Patterson, L., Alexandris, A., Hanson, P.S., McKeith, I.G., Attems, J., Morris, C.M., 2018. Regional levels of physiological α -synuclein are directly associated with Lewy body pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 135, 153–154. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1787-6>
- Espay, A.J., Vizcarra, J.A., Marsili, L., Lang, A.E., Simon, D.K., Merola, A., Josephs, K.A., Fasano, A., Morgante, F., Savica, R., Greenamyre, J.T., Cambi, F., Yamasaki, T.R., Tanner, C.M., Gan-Or, Z., Litvan, I., Mata, I.F., Zabetian, C.P., Brundin, P., Fernandez, H.H., Standaert, D.G., Kauffman, M.A., Schwarzschild, M.A., Sardi, S.P., Sherer, T., Perry, G., Leverenz, J.B., 2019. Revisiting protein aggregation as pathogenic in sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *Neurology* 92, 329–337. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006926>
- Ezzat, K., Pernemalm, M., Pålsson, S., Roberts, T.C., Järver, P., Dondalska, A., Bestas, B., Sobkowiak, M.J., Levänen, B., Sköld, M., Thompson, E.A., Saher, O., Kari, O.K., Lajunen, T., Ekström, E.S., Nilsson, C., Ishchenko, Y., Malm, T., Wood, M.J.A., Power, U.F., Masich, S., Lindén, A., Sandberg, J.K., Lehtiö, J., Spetz, A.-L., Andaloussi, S.E., 2019. The viral protein corona directs viral pathogenesis and amyloid aggregation. *Nat. Commun.* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10192-2>
- Fabbrini, G., Brotchie, J.M., Grandas, F., Nomoto, M., Goetz, C.G., 2007. Levodopa-induced dyskinesias. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 22, 1379–1389; quiz 1523. <https://doi.org/10.1002/mds.21475>
- Fagerqvist, T., Näsström, T., Ihse, E., Lindström, V., Sahlin, C., Tucker, S.M.F., Kasaryan, A., Karlsson, M., Nikolajeff, F., Schell, H., Outeiro, T.F., Kahle, P.J., Lannfelt, L., Ingelsson, M., Bergström, J., 2013. Off-pathway α -synuclein oligomers seem to alter α -synuclein turnover in a cell model but lack seeding capability

- in vivo. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* 20, 233–244. <https://doi.org/10.3109/13506129.2013.835726>
- Fanciulli, A., Wenning, G.K., 2015. Multiple-system atrophy. *N. Engl. J. Med.* 372, 249–263. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1311488>
- Fanning, S., Haque, A., Imberdis, T., Baru, V., Barrasa, M.I., Nuber, S., Termine, D., Ramalingam, N., Ho, G.P.H., Noble, T., Sandoe, J., Lou, Y., Landgraf, D., Freyzon, Y., Newby, G., Soldner, F., Terry-Kantor, E., Kim, T.-E., Hofbauer, H.F., Becuwe, M., Jaenisch, R., Pincus, D., Clish, C.B., Walther, T.C., Farese, R.V., Srinivasan, S., Welte, M.A., Kohlwein, S.D., Dettmer, U., Lindquist, S., Selkoe, D., 2019. Lipidomic Analysis of α -Synuclein Neurotoxicity Identifies Stearoyl CoA Desaturase as a Target for Parkinson Treatment. *Mol. Cell* 73, 1001-1014.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.028>
- Fares, M.-B., Maco, B., Oueslati, A., Rockenstein, E., Ninkina, N., Buchman, V.L., Masliah, E., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512876113>
- Fauvet, B., Mbefo, M.K., Fares, M.-B., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M.T., Tsika, E., Coune, P., Prudent, M., Lion, N., Eliezer, D., Moore, D.J., Schneider, B., Aebischer, P., El-Agnaf, O.M., Masliah, E., Lashuel, H.A., 2012. α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* 287, 15345–15364. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318949>
- Feinerman, O., Rotem, A., Moses, E., 2008. Reliable neuronal logic devices from patterned hippocampal cultures. *Nat. Phys.* 4, 967–973. <https://doi.org/10.1038/nphys1099>
- Fenske, P., Grauel, M.K., Brockmann, M.M., Dorn, A.L., Trimbuch, T., Rosenmund, C., 2019. Autaptic cultures of human induced neurons as a versatile platform for studying synaptic function and neuronal morphology. *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41259-1>
- Fenyi, A., Coens, A., Bellande, T., Melki, R., Bousset, L., 2018. Assessment of the efficacy of different procedures that remove and disassemble alpha-synuclein, tau and A-beta fibrils from laboratory material and surfaces. *Sci. Rep.* 8, 10788. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28856-2>
- Ferese, R., Modugno, N., Campopiano, R., Santilli, M., Zampatti, S., Giardina, E., Nardone, A., Postorivo, D., Fornai, F., Novelli, G., Romoli, E., Ruggieri, S., Gambardella, S., 2015. Four Copies of SNCA Responsible for Autosomal Dominant Parkinson's Disease in Two Italian Siblings. *Park. Dis.* 2015, 546462. <https://doi.org/10.1155/2015/546462>
- Fernandes, H.J.R., Hartfield, E.M., Christian, H.C., Emmanouilidou, E., Zheng, Y., Booth, H., Bogetofte, H., Lang, C., Ryan, B.J., Sardi, S.P., Badger, J., Vowles, J., Evetts, S., Tofaris, G.K., Vekrellis, K., Talbot, K., Hu, M.T., James, W., Cowley, S.A., Wade-Martins, R., 2016. ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular α -Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Rep.* 6, 342–356. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.01.013>
- Ferrone, F.A., 2015. Assembly of A β proceeds via monomeric nuclei. *J. Mol. Biol.* 427, 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.10.028>
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., Raposo, G., 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9683–9688. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308413101>
- Fitzpatrick, A.W.P., Debelouchina, G.T., Bayro, M.J., Clare, D.K., Caporini, M.A., Bajaj, V.S., Jaroniec, C.P., Wang, L., Ladizhansky, V., Müller, S.A., MacPhee, C.E., Waudby, C.A., Mott, H.R., Simone, A.D., Knowles, T.P.J., Saibil, H.R., Vendruscolo, M., Orlova, E.V., Griffin, R.G., Dobson, C.M., 2013. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 5468–5473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219476110>
- Flavin, W.P., Bousset, L., Green, Z.C., Chu, Y., Skarpathiotis, S., Chaney, M.J., Kordower, J.H., Melki, R., Campbell, E.M., 2017. Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 134, 629–653. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1722-x>
- Fontaine, S.N., Zheng, D., Sabbagh, J.J., Martin, M.D., Chaput, D., Darling, A., Trotter, J.H., Stothert, A.R., Nordhues, B.A., Lussier, A., Baker, J., Shelton, L., Kahn, M., Blair, L.J., Stevens, S.M., Dickey, C.A., 2016. DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. *EMBO J.* 35, 1537–1549. <https://doi.org/10.15252/embj.201593489>

- Forró, C., Thompson-Steckel, G., Weaver, S., Weydert, S., Ihle, S., Dermutz, H., Aebersold, M.J., Pilz, R., Demkó, L., Vörös, J., 2018. Modular microstructure design to build neuronal networks of defined functional connectivity. *Biosens. Bioelectron.* 122, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.075>
- Fortin, D.L., Nemani, V.M., Voglmaier, S.M., Anthony, M.D., Ryan, T.A., Edwards, R.H., 2005. Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 10913–10921. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2922-05.2005>
- Fortin, D.L., Troyer, M.D., Nakamura, K., Kubo, S., Anthony, M.D., Edwards, R.H., 2004. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 6715–6723. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1594-04.2004>
- Fraser, H., 1982. Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature* 295, 149–150. <https://doi.org/10.1038/295149a0>
- Freeman, D., Cedillos, R., Choyke, S., Lukic, Z., McGuire, K., Marvin, S., Burrage, A.M., Sudholt, S., Rana, A., O'Connor, C., Wiethoff, C.M., Campbell, E.M., 2013. Alpha-synuclein induces lysosomal rupture and cathepsin dependent reactive oxygen species following endocytosis. *PloS One* 8, e62143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062143>
- Freundt, E.C., Maynard, N., Clancy, E.K., Roy, S., Bousset, L., Sourigues, Y., Covert, M., Melki, R., Kirkegaard, K., Brahic, M., 2012. Neuron-to-neuron transmission of α -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann. Neurol.* 72, 517–524. <https://doi.org/10.1002/ana.23747>
- Fricke, R., Zentis, P.D., Rajappa, L.T., Hofmann, B., Banzet, M., Offenhäusser, A., Meffert, S.H., 2011. Axon guidance of rat cortical neurons by microcontact printed gradients. *Biomaterials* 32, 2070–2076. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.036>
- Frigerio, R., Fujishiro, H., Ahn, T.-B., Josephs, K.A., Maraganore, D.M., DelleDonne, A., Parisi, J.E., Klos, K.J., Boeve, B.F., Dickson, D.W., Ahlskog, J.E., 2011. Incidental Lewy body disease: do some cases represent a preclinical stage of dementia with Lewy bodies? *Neurobiol. Aging* 32, 857–863. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.05.019>
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., Iwatsubo, T., 2002a. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 4, 160–164. <https://doi.org/10.1038/ncb748>
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., Iwatsubo, T., 2002b. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 4, 160–164. <https://doi.org/10.1038/ncb748>
- Furshpan, E.J., MacLeish, P.R., O'Lague, P.H., Potter, D.D., 1976. Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: evidence for cholinergic, adrenergic, and dual-function neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 4225–4229. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.4225>
- Fussi, N., Höllerhage, M., Chakroun, T., Nykänen, N.-P., Rösler, T.W., Koeglsperger, T., Wurst, W., Behrends, C., Höglinger, G.U., 2018. Exosomal secretion of α -synuclein as protective mechanism after upstream blockage of macroautophagy. *Cell Death Dis.* 9, 757. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0816-2>
- Gai, W.P., Power, J.H., Blumbergs, P.C., Blessing, W.W., 1998. Multiple-system atrophy: a new alpha-synuclein disease? *Lancet Lond. Engl.* 352, 547–548. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)79256-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)79256-4)
- Gaig, C., Martí, M.J., Ezquerro, M., Rey, M.J., Cardozo, A., Tolosa, E., 2007. G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 78, 626–628. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.107904>
- Gajdusek, D.C., 1988. Transmissible and non-transmissible amyloidoses: autocatalytic post-translational conversion of host precursor proteins to beta-pleated sheet configurations. *J. Neuroimmunol.* 20, 95–110.
- Gajdusek, D.C., 1977. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197, 943–960. <https://doi.org/10.1126/science.142303>
- Gajdusek, D.C., 1967. Slow-virus infections of the nervous system. *N. Engl. J. Med.* 276, 392–400. <https://doi.org/10.1056/NEJM196702162760708>
- Gajdusek, D.C., 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. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(59\)90251-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(59)90251-7)

- Gallegos, S., Pacheco, C., Peters, C., Opazo, C.M., Aguayo, L.G., 2015. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 9, 59. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00059>
- Galloway, P.G., Mulvihill, P., Perry, G., 1992. Filaments of Lewy bodies contain insoluble cytoskeletal elements. *Am. J. Pathol.* 140, 809–822.
- Galvagnion, C., Brown, J.W.P., Ouberaï, M.M., Flagmeier, P., Vendruscolo, M., Buell, A.K., Sparr, E., Dobson, C.M., 2016. Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 7065–7070. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601899113>
- Galvagnion, C., Buell, A.K., Meisl, G., Michaels, T.C.T., Vendruscolo, M., Knowles, T.P.J., Dobson, C.M., 2015. Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat. Chem. Biol.* 11, 229–234. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1750>
- Galvin, J.E., Schuck, T.M., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2001. Differential expression and distribution of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in the developing human substantia nigra. *Exp. Neurol.* 168, 347–355. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7615>
- Gan-Or, Z., Liang, C., Alcalay, R.N., 2018. GBA-Associated Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 18, 44. <https://doi.org/10.1007/s11910-018-0860-4>
- George, J.M., Jin, H., Woods, W.S., Clayton, D.F., 1995. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15, 361–372.
- Ghee, M., Melki, R., Michot, N., Mallet, J., 2005. PA700, the regulatory complex of the 26S proteasome, interferes with alpha-synuclein assembly. *FEBS J.* 272, 4023–4033. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04776.x>
- Ghosh, D., Singh, P.K., Sahay, S., Jha, N.N., Jacob, R.S., Sen, S., Kumar, A., Riek, R., Maji, S.K., 2015. Structure based aggregation studies reveal the presence of helix-rich intermediate during α -Synuclein aggregation. *Sci. Rep.* 5, 9228. <https://doi.org/10.1038/srep09228>
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2000. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290, 985–989. <https://doi.org/10.1126/science.290.5493.985>
- Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008919200>
- Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C., Asher, D.M., Alpers, M.P., Beck, E., Daniel, P.M., Matthews, W.B., 1968. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161, 388–389. <https://doi.org/10.1126/science.161.3839.388>
- 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., Kaufmann, H., Klockgether, T., Lees, A., Poewe, W., Quinn, N., Revesz, T., Robertson, D., Sandroni, P., Seppi, K., Vidailhet, M., 2008. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 71, 670–676. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000324625.00404.15>
- Ginsberg, S.D., Galvin, J.E., Chiu, T.S., Lee, V.M., Masliah, E., Trojanowski, J.Q., 1998. RNA sequestration to pathological lesions of neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 96, 487–494.
- 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., Barlowe, C., Lindquist, S., 2008. The Parkinson's disease protein α -synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 145–150. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710685105>
- Gladkov, A., Pigareva, Y., Kutyina, D., Kolpakov, V., Bukatin, A., Mukhina, I., Kazantsev, V., Pimashkin, A., 2017. Design of Cultured Neuron Networks in vitro with Predefined Connectivity Using Asymmetric Microfluidic Channels. *Sci. Rep.* 7, 15625. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15506-2>
- Glatzel, M., Aguzzi, A., 2000. PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J. Gen. Virol.* 81, 2813–2821. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-11-2813>
- Glaysner, B.R., Mabbott, N.A., 2007. Role of the GALT in scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 3757–3766. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3757>
- Glenner, G.G., Ein, D., Eanes, E.D., Bladen, H.A., Terry, W., Page, D.L., 1971. Creation of “amyloid” fibrils from Bence Jones proteins in vitro. *Science* 174, 712–714. <https://doi.org/10.1126/science.174.4010.712>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1255555>

- Goedert, M., Eisenberg, D.S., Crowther, R.A., 2017a. Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 40, 189–210. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031153>
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., 2017b. The Synucleinopathies: Twenty Years On. *J. Park. Dis.* 7, S51–S69. <https://doi.org/10.3233/JPD-179005>
- Goedert, M., Spillantini, M.G., 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science* 314, 777–781. <https://doi.org/10.1126/science.1132814>
- Goedert, M., Spillantini, M.G., 1998. Lewy body diseases and multiple system atrophy as α -synucleinopathies. *Mol. Psychiatry* 3, 462–465. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000458>
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Del Tredici, K., Braak, H., 2013. 100 years of Lewy pathology. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 13–24. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.242>
- Golovko, M.Y., Rosenberger, T.A., Faergeman, N.J., Feddersen, S., Cole, N.B., Pribill, I., Berger, J., Nussbaum, R.L., Murphy, E.J., 2006. Acyl-CoA synthetase activity links wild-type but not mutant alpha-synuclein to brain arachidonate metabolism. *Biochemistry* 45, 6956–6966. <https://doi.org/10.1021/bi0600289>
- Golovko, M.Y., Rosenberger, T.A., Feddersen, S., Faergeman, N.J., Murphy, E.J., 2007. Alpha-synuclein gene ablation increases docosaehaenoic acid incorporation and turnover in brain phospholipids. *J. Neurochem.* 101, 201–211. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04357.x>
- Gómez-Tortosa, E., Newell, K., Irizarry, M.C., Sanders, J.L., Hyman, B.T., 2000. alpha-Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 99, 352–357.
- Gonçalves, S.A., Outeiro, T.F., 2017. Traffic jams and the complex role of α -Synuclein aggregation in Parkinson disease. *Small GTPases* 8, 78–84. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1199191>
- Goodwin, J., Nath, S., Engelborghs, Y., Pountney, D.L., 2013. Raised calcium and oxidative stress cooperatively promote alpha-synuclein aggregate formation. *Neurochem. Int.* 62, 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.11.004>
- Gosavi, N., Lee, H.-J., Lee, J.S., Patel, S., Lee, S.-J., 2002. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. *J. Biol. Chem.* 277, 48984–48992. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208194200>
- Gousset, K., Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D.T., Chenouard, N., de Chaumont, F., Martino, A., Enninga, J., Olivo-Marin, J.-C., Männel, D., Zurzolo, C., 2009. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat. Cell Biol.* 11, 328–336. <https://doi.org/10.1038/ncb1841>
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B., Cohen, F.E., 2004. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8342–8347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402254101>
- Green, A.J.E., Zanusso, G., 2018. Prion protein amplification techniques. *Handb. Clin. Neurol.* 153, 357–370. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63945-5.00019-2>
- Greenwald, J., Riek, R., 2010. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Struct. Lond. Engl.* 1993 18, 1244–1260. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.08.009>
- Greten-Harrison, B., Polydoro, M., Morimoto-Tomita, M., Diao, L., Williams, A.M., Nie, E.H., Makani, S., Tian, N., Castillo, P.E., Buchman, V.L., Chandra, S.S., 2010. $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 19573–19578. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005005107>
- Gribaudo, S., Tixador, P., Bousset, L., Fenyi, A., Lino, P., Melki, R., Peyrin, J.-M., Perrier, A.L., 2019. Propagation of α -Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network. *Stem Cell Rep.* 12, 230–244. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.007>
- Griffith, J.S., 1967. Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043–1044. <https://doi.org/10.1038/2151043a0>
- Gross, O.P., von Gersdorff, H., 2016. Recycling at synapses. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17692>
- Guerrero-Ferreira, R., Taylor, N.M., Mona, D., Ringler, P., Lauer, M.E., Riek, R., Britschgi, M., Stahlberg, H., 2018. Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.36402>
- Gunnarsson, L.-G., Bodin, L., 2017. Parkinson's disease and occupational exposures: a systematic literature review and meta-analyses. *Scand. J. Work. Environ. Health* 43, 197–209. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3641>
- 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., Lee, V.M.Y., 2013. Distinct α -synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell* 154, 103–117. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.057>
- Guo, J.L., Lee, V.M.Y., 2014. Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat. Med.* 20, 130–138. <https://doi.org/10.1038/nm.3457>

- Gureviciene, I., Gurevicius, K., Tanila, H., 2007. Role of alpha-synuclein in synaptic glutamate release. *Neurobiol. Dis.* 28, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.06.016>
- Gustafsson, G., Lööf, C., Persson, E., Lázaro, D.F., Takeda, S., Bergström, J., Erlandsson, A., Sehlin, D., Balaj, L., György, B., Hallbeck, M., Outeiro, T.F., Breakefield, X.O., Hyman, B.T., Ingelsson, M., 2018. Secretion and Uptake of α -Synuclein Via Extracellular Vesicles in Cultured Cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38, 1539–1550. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0622-5>
- Hadlow, W.J., 1959. SCRAPIE AND KURU. *The Lancet* 274, 289–290. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(59\)92081-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(59)92081-1)
- Hamilton, R.L., 2000. Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 10, 378–384.
- Hansen, C., Angot, E., Bergström, A.-L., Steiner, J.A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T.F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., Li, J.-Y., Brundin, P., 2011. α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J. Clin. Invest.* 121, 715–725. <https://doi.org/10.1172/JCI43366>
- Hardy, J., 2005. Expression of normal sequence pathogenic proteins for neurodegenerative disease contributes to disease risk: “permissive templating” as a general mechanism underlying neurodegeneration. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 578–581. <https://doi.org/10.1042/BST0330578>
- Hardy, J., Lewis, P., Revesz, T., Lees, A., Paisan-Ruiz, C., 2009. The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.03.008>
- Harischandra, D.S., Rokad, D., Neal, M.L., Ghaisas, S., Manne, S., Sarkar, S., Panicker, N., Zenitsky, G., Jin, H., Lewis, M., Huang, X., Anantharam, V., Kanthasamy, A., Kanthasamy, A.G., 2019. Manganese promotes the aggregation and prion-like cell-to-cell exosomal transmission of α -synuclein. *Sci. Signal.* 12. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aau4543>
- Harris, D.A., Lele, P., Snider, W.D., 1993. Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4309–4313. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4309>
- Harrison, R.G., Greenman, M.J., Mall, F.P., Jackson, C.M., 1907. Observations of the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.* 1, 116–128. <https://doi.org/10.1002/ar.1090010503>
- Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 3E [WWW Document], n.d. URL <https://lib.hpu.edu.vn/handle/123456789/32628> (accessed 8.7.19).
- Hasegawa, M., Fujiwara, H., Nonaka, T., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Mann, D., Iwatsubo, T., 2002. Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J. Biol. Chem.* 277, 49071–49076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208046200>
- Hashimoto, M., Takenouchi, T., Mallory, M., Masliah, E., Takeda, A., 2000. The role of NAC in amyloidogenesis in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 156, 734–736. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64777-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64777-3)
- Hawkes, C.H., Del Tredici, K., Braak, H., 2007. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 599–614. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00874.x>
- He, K., Gkioxari, G., Dollár, P., Girshick, R., 2017. Mask R-CNN, in: 2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV). Presented at the 2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV), pp. 2980–2988. <https://doi.org/10.1109/ICCV.2017.322>
- Hegde, M.L., Rao, K.S.J., 2007. DNA induces folding in alpha-synuclein: understanding the mechanism using chaperone property of osmolytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 464, 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.042>
- Heikkila, R.E., Cabbat, F.S., Manzino, L., Duvoisin, R.C., 1984. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice. *Neuropharmacology* 23, 711–713. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(84\)90170-9](https://doi.org/10.1016/0028-3908(84)90170-9)
- Heintz-Buschart, A., Pandey, U., Wicke, T., Sixel-Döring, F., Janzen, A., Sittig-Wiegand, E., Trenkwalder, C., Oertel, W.H., Mollenhauer, B., Wilmes, P., 2018. The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 33, 88–98. <https://doi.org/10.1002/mds.27105>
- Helwig, M., Klinkenberg, M., Rusconi, R., Musgrove, R.E., Majbour, N.K., El-Agnaf, O.M.A., Ulusoy, A., Di Monte, D.A., 2016. Brain propagation of transduced α -synuclein involves non-fibrillar protein species and is enhanced in α -synuclein null mice. *Brain* 139, 856–870. <https://doi.org/10.1093/brain/awv376>

- Henderson, N.T., Le Marchand, S.J., Hruska, M., Hippenmeyer, S., Luo, L., Dalva, M.B., 2019. Ephrin-B3 controls excitatory synapse density through cell-cell competition for EphBs. *eLife* 8, e41563. <https://doi.org/10.7554/eLife.41563>
- Hershey, A.D., Chase, M., 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36, 39–56. <https://doi.org/10.1085/jgp.36.1.39>
- Higashi, T., Tanaka, S., Iida, T., Okabe, S., 2018. Synapse Elimination Triggered by BMP4 Exocytosis and Presynaptic BMP Receptor Activation. *Cell Rep.* 22, 919–929. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.101>
- Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J., Lantos, P., 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389, 448–450, 526. <https://doi.org/10.1038/38925>
- Hoffmann, A., Ettle, B., Bruno, A., Kulinich, A., Hoffmann, A.-C., von Wittgenstein, J., Winkler, J., Xiang, W., Schlachetzki, J.C.M., 2016. Alpha-synuclein activates BV2 microglia dependent on its aggregation state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 479, 881–886. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.109>
- Holdorff, B., 2019. Centenary of Tretiakoff's thesis on the morphology of Parkinson's disease, evolved on the grounds of encephalitis lethargica pathology. *J. Hist. Neurosci.* 1–12. <https://doi.org/10.1080/0964704X.2019.1622361>
- Holloway, P.M., Hallinan, G.I., Hegde, M., Lane, S.I.R., Deinhardt, K., West, J., 2019. Asymmetric confinement for defining outgrowth directionality. *Lab. Chip* 19, 1484–1489. <https://doi.org/10.1039/c9lc00078j>
- 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., Kotzbauer, P.T., Miller, T.M., Papy-Garcia, D., Diamond, M.I., 2013. Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3138–3147. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301440110>
- Honegger, T., Scott, M.A., Yanik, M.F., Voldman, J., 2013. Electrokinetic confinement of axonal growth for dynamically configurable neural networks. *Lab. Chip* 13, 589–598. <https://doi.org/10.1039/c2lc41000a>
- Honegger, T., Thielen, M.I., Feizi, S., Sanjana, N.E., Voldman, J., 2016. Microfluidic neurite guidance to study structure-function relationships in topologically-complex population-based neural networks. *Sci. Rep.* 6, 28384. <https://doi.org/10.1038/srep28384>
- Horonchik, L., Tzaban, S., Ben-Zaken, O., Yedidia, Y., Rouvinski, A., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Vlodavsky, I., Taraboulos, A., 2005. Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. *J. Biol. Chem.* 280, 17062–17067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500122200>
- Hostiuc, S., Drima, E., Buda, O., 2016. Shake the Disease. Georges Marinesco, Paul Blocq and the Pathogenesis of Parkinsonism, 1893. *Front. Neuroanat.* 10, 74. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00074>
- Huang, Z., Xu, Z., Wu, Y., Zhou, Y., 2011. Determining nuclear localization of alpha-synuclein in mouse brains. *Neuroscience* 199, 318–332. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.016>
- Hughes, K.C., Gao, X., Kim, I.Y., Wang, M., Weisskopf, M.G., Schwarzschild, M.A., Ascherio, A., 2017. Intake of dairy foods and risk of Parkinson disease. *Neurology* 89, 46–52. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004057>
- Huh, D., Matthews, B.D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H.Y., Ingber, D.E., 2010. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 328, 1662–1668. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>
- Ibáñez, P., Bonnet, A.-M., Débarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Dürr, A., Brice, A., 2004. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet Lond. Engl.* 364, 1169–1171. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17104-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17104-3)
- Ihse, E., Yamakado, H., van Wijk, X.M., Lawrence, R., Esko, J.D., Masliah, E., 2017. Cellular internalization of alpha-synuclein aggregates by cell surface heparan sulfate depends on aggregate conformation and cell type. *Sci. Rep.* 7, 9008. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08720-5>
- Ingber, D.E., 2018. Developmentally inspired human “organs on chips.” *Dev. Camb. Engl.* 145. <https://doi.org/10.1242/dev.156125>
- Inglis, K.J., Chereau, D., Brigham, E.F., Chiou, S.-S., Schöbel, S., Frigon, N.L., Yu, M., Caccavello, R.J., Nelson, S., Motter, R., Wright, S., Chian, D., Santiago, P., Soriano, F., Ramos, C., Powell, K., Goldstein, J.M., Babcock, M., Yednock, T., Bard, F., Basi, G.S., Sham, H., Chilcote, T.J., McConlogue, L., Griswold-Prenner, I., Anderson, J.P., 2009. Polo-like kinase 2 (PLK2) phosphorylates alpha-synuclein at serine 129 in central nervous system. *J. Biol. Chem.* 284, 2598–2602. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800206200>
- Islam, M.S., Moore, D.J., 2017. Mechanisms of LRRK2-dependent neurodegeneration: role of enzymatic activity and protein aggregation. *Biochem. Soc. Trans.* 45, 163–172. <https://doi.org/10.1042/BST20160264>

- Itzhaki, R.F., Lathe, R., Balin, B.J., Ball, M.J., Bearer, E.L., Braak, H., Bullido, M.J., Carter, C., Clerici, M., Cosby, S.L., Del Tredici, K., Field, H., Fulop, T., Grassi, C., Griffin, W.S.T., Haas, J., Hudson, A.P., Kamer, A.R., Kell, D.B., Licastro, F., Letenneur, L., Lövheim, H., Mancuso, R., Miklossy, J., Oth, C., Palamara, A.T., Perry, G., Preston, C., Pretorius, E., Strandberg, T., Tabet, N., Taylor-Robinson, S.D., Whittum-Hudson, J.A., 2016. Microbes and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 51, 979–984. <https://doi.org/10.3233/JAD-160152>
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., 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.
- Jackson, G.S., Hosszu, L.L., Power, A., Hill, A.F., Kenney, J., Saibil, H., Craven, C.J., Waltho, J.P., Clarke, A.R., Collinge, J., 1999. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* 283, 1935–1937. <https://doi.org/10.1126/science.283.5409.1935>
- Jackson, M.V., Morrison, T.J., Doherty, D.F., McAuley, D.F., Matthay, M.A., Kissenpennig, A., O'Kane, C.M., Krasnodembskaya, A.D., 2016. Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells Dayt. Ohio* 34, 2210–2223. <https://doi.org/10.1002/stem.2372>
- Jahn, T.R., Makin, O.S., Morris, K.L., Marshall, K.E., Tian, P., Sikorski, P., Serpell, L.C., 2010. The common architecture of cross-beta amyloid. *J. Mol. Biol.* 395, 717–727. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.039>
- Jakes, R., Spillantini, M.G., Goedert, M., 1994. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* 345, 27–32.
- Jang, A., Lee, H.-J., Suk, J.-E., Jung, J.-W., Kim, K.-P., Lee, S.-J., 2010. Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *J. Neurochem.* 113, 1263–1274. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06695.x>
- Jarosz, D.F., Khurana, V., 2017. Specification of Physiologic and Disease States by Distinct Proteins and Protein Conformations. *Cell* 171, 1001–1014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.047>
- Jarrett, J.T., Lansbury, P.T., 1993. Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055–1058. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90635-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90635-4)
- Jellinger, K.A., 2009. A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 730–740. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.07.006>
- Jellinger, K.A., 1991. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol. Chem. Neuropathol.* 14, 153–197.
- Jellinger, K.A., Lantos, P.L., 2010. Papp-Lantos inclusions and the pathogenesis of multiple system atrophy: an update. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 657–667. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0672-3>
- Jellinger, K.A., Seppi, K., Wenning, G.K., 2005. Grading of neuropathology in multiple system atrophy: proposal for a novel scale. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 20 Suppl 12, S29-36. <https://doi.org/10.1002/mds.20537>
- Jenner, P., Morris, H.R., Robbins, T.W., Goedert, M., Hardy, J., Ben-Shlomo, Y., Bolam, P., Burn, D., Hindle, J.V., Brooks, D., 2013. Parkinson's disease--the debate on the clinical phenomenology, aetiology, pathology and pathogenesis. *J. Park. Dis.* 3, 1–11. <https://doi.org/10.3233/JPD-130175>
- Jensen, M.B., Bhatia, V.K., Jao, C.C., Rasmussen, J.E., Pedersen, S.L., Jensen, K.J., Langen, R., Stamou, D., 2011. Membrane curvature sensing by amphipathic helices: a single liposome study using α -synuclein and annexin B12. *J. Biol. Chem.* 286, 42603–42614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271130>
- Jensen, P.H., Hager, H., Nielsen, M.S., Hojrup, P., Gliemann, J., Jakes, R., 1999. alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J. Biol. Chem.* 274, 25481–25489. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25481>
- Ji, H., Liu, Y.E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., Joseph, B.K., Rosen, C., Shi, Y.E., 1997. Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res.* 57, 759–764.
- Jiang, P., Gan, M., Yen, S.-H., McLean, P.J., Dickson, D.W., 2017. Impaired endo-lysosomal membrane integrity accelerates the seeding progression of α -synuclein aggregates. *Sci. Rep.* 7, 7690. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08149-w>
- Jiang, W., Ju, C., Jiang, H., Zhang, D., 2014. Dairy foods intake and risk of Parkinson's disease: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Epidemiol.* 29, 613–619. <https://doi.org/10.1007/s10654-014-9921-4>

- Jo, E., Fuller, N., Rand, R.P., St George-Hyslop, P., Fraser, P.E., 2002. Defective membrane interactions of familial Parkinson's disease mutant A30P alpha-synuclein. *J. Mol. Biol.* 315, 799–807. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5269>
- Johansen, K.K., Torp, S.H., Farrer, M.J., Gustavsson, E.K., Aasly, J.O., 2018. A Case of Parkinson's Disease with No Lewy Body Pathology due to a Homozygous Exon Deletion in Parkin. *Case Rep. Neurol. Med.* 2018, 6838965. <https://doi.org/10.1155/2018/6838965>
- Johnson, K.A., Gregas, M., Becker, J.A., Kinnecom, C., Salat, D.H., Moran, E.K., Smith, E.E., Rosand, J., Rentz, D.M., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Price, J.C., DeKosky, S.T., Fischman, A.J., Greenberg, S.M., 2007. Imaging of amyloid burden and distribution in cerebral amyloid angiopathy. *Ann. Neurol.* 62, 229–234. <https://doi.org/10.1002/ana.21164>
- Jucker, M., Walker, L.C., 2018. Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* 21, 1341–1349. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0238-6>
- Jucker, M., Walker, L.C., 2013. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501, 45–51. <https://doi.org/10.1038/nature12481>
- Kahle, P.J., Neumann, M., Ozmen, L., Haass, C., 2000. Physiology and pathophysiology of alpha-synuclein. *Cell culture and transgenic animal models based on a Parkinson's disease-associated protein.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920, 33–41.
- Kalaitzakis, M.E., Graeber, M.B., Gentleman, S.M., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00923.x>
- Kalia, L.V., Lang, A.E., 2015. Parkinson's disease. *Lancet Lond. Engl.* 386, 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kang, L., Moriarty, G.M., Woods, L.A., Ashcroft, A.E., Radford, S.E., Baum, J., 2012. N-terminal acetylation of α -synuclein induces increased transient helical propensity and decreased aggregation rates in the intrinsically disordered monomer. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 21, 911–917. <https://doi.org/10.1002/pro.2088>
- Karpinar, D.P., Balija, M.B.G., Kügler, S., Opazo, F., Rezaei-Ghaleh, N., Wender, N., Kim, H.-Y., Taschenberger, G., Falkenburger, B.H., Heise, H., Kumar, A., Riedel, D., Fichtner, L., Voigt, A., Braus, G.H., Giller, K., Becker, S., Herzig, A., Baldus, M., Jäckle, H., Eimer, S., Schulz, J.B., Griesinger, C., Zweckstetter, M., 2009. Prefibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *EMBO J.* 28, 3256–3268. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.257>
- Kasai, T., Tokuda, T., Yamaguchi, N., Watanabe, Y., Kametani, F., Nakagawa, M., Mizuno, T., 2008. Cleavage of normal and pathological forms of alpha-synuclein by neurosin in vitro. *Neurosci. Lett.* 436, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.02.057>
- Kay, D.M., Kramer, P., Higgins, D., Zabetian, C.P., Payami, H., 2005. Escaping Parkinson's disease: a neurologically healthy octogenarian with the LRRK2 G2019S mutation. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 20, 1077–1078. <https://doi.org/10.1002/mds.20618>
- Kellie, J.F., Higgs, R.E., Ryder, J.W., Major, A., Beach, T.G., Adler, C.H., Merchant, K., Knierman, M.D., 2014. Quantitative measurement of intact alpha-synuclein proteoforms from post-mortem control and Parkinson's disease brain tissue by intact protein mass spectrometry. *Sci. Rep.* 4, 5797. <https://doi.org/10.1038/srep05797>
- Kiely, A.P., Asi, Y.T., Kara, E., Limousin, P., Ling, H., Lewis, P., Proukakis, C., Quinn, N., Lees, A.J., Hardy, J., Revesz, T., Houlden, H., Holton, J.L., 2013. α -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 753–769. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1096-7>
- Killinger, B.A., Madaj, Z., Sikora, J.W., Rey, N., Haas, A.J., Vepa, Y., Lindqvist, D., Chen, H., Thomas, P.M., Brundin, P., Brundin, L., Labrie, V., 2018. The vermiform appendix impacts the risk of developing Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* 10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar5280>
- Kim, H.J., Huh, D., Hamilton, G., Ingber, D.E., 2012. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab. Chip* 12, 2165–2174. <https://doi.org/10.1039/c2lc40074j>
- Kim, Y.M., Jang, W.H., Quezado, M.M., Oh, Y., Chung, K.C., Junn, E., Mouradian, M.M., 2011. Proteasome inhibition induces α -synuclein SUMOylation and aggregate formation. *J. Neurol. Sci.* 307, 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.04.015>

- Kimberlin, R.H., Walker, C.A., 1986. Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J. Gen. Virol.* 67 (Pt 2), 255–263. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-2-255>
- Kitagishi, Y., Nakano, N., Ogino, M., Ichimura, M., Minami, A., Matsuda, S., 2017. PINK1 signaling in mitochondrial homeostasis and in aging (Review). *Int. J. Mol. Med.* 39, 3–8. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2827>
- Kitamoto, T., Tateishi, J., Tashima, T., Takeshita, I., Barry, R.A., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., 1986. Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann. Neurol.* 20, 204–208. <https://doi.org/10.1002/ana.410200205>
- Klaips, C.L., Jayaraj, G.G., Hartl, F.U., 2018. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J. Cell Biol.* 217, 51–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709072>
- Klatzo, I., Gajdusek, D.C., Zigas, V., 1959. Pathology of Kuru. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 8, 799–847.
- Klau, M., Hartmann, M., Erdmann, K.S., Heumann, R., Lessmann, V., 2001. Reduced number of functional glutamatergic synapses in hippocampal neurons overexpressing full-length TrkB receptors. *J. Neurosci. Res.* 66, 327–336. <https://doi.org/10.1002/jnr.10007>
- Klöhn, P.-C., Castro-Seoane, R., Collinge, J., 2013. Exosome release from infected dendritic cells: a clue for a fast spread of prions in the periphery? *J. Infect.* 67, 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.07.024>
- Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., 2014. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 384–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>
- Knowles, T.P.J., Waudby, C.A., Devlin, G.L., Cohen, S.I.A., Aguzzi, A., Vendruscolo, M., Terentjev, E.M., Welland, M.E., Dobson, C.M., 2009. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* 326, 1533–1537. <https://doi.org/10.1126/science.1178250>
- Kokhan, V.S., Afanasyeva, M.A., Van'kin, G.I., 2012. α -Synuclein knockout mice have cognitive impairments. *Behav. Brain Res.* 231, 226–230. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.026>
- Koles, K., Nunnari, J., Korkut, C., Barria, R., Brewer, C., Li, Y., Leszyk, J., Zhang, B., Budnik, V., 2012. Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons. *J. Biol. Chem.* 287, 16820–16834. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.342667>
- Konno, M., Hasegawa, T., Baba, T., Miura, E., Sugeno, N., Kikuchi, A., Fiesel, F.C., Sasaki, T., Aoki, M., Itoyama, Y., Takeda, A., 2012. Suppression of dynamin GTPase decreases α -synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Mol. Neurodegener.* 7, 38. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-38>
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., Olanow, C.W., 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* 14, 504–506. <https://doi.org/10.1038/nm1747>
- Korkut, C., Ataman, B., Ramachandran, P., Ashley, J., Barria, R., Gherbesi, N., Budnik, V., 2009. Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell* 139, 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.051>
- Kovacs, G.G., Breydo, L., Green, R., Kis, V., Puska, G., Lőrincz, P., Perju-Dumbrava, L., Giera, R., Pirker, W., Lutz, M., Lachmann, I., Budka, H., Uversky, V.N., Molnár, K., László, L., 2014. Intracellular processing of disease-associated α -synuclein in the human brain suggests prion-like cell-to-cell spread. *Neurobiol. Dis.* 69, 76–92. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.020>
- Kratzel, C., Krüger, D., Beekes, M., 2007. Prion propagation in a nerve conduit model containing segments devoid of axons. *J. Gen. Virol.* 88, 3479–3485. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83187-0>
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schöls, L., Riess, O., 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18, 106–108. <https://doi.org/10.1038/ng0298-106>
- Krumova, P., Meulmeister, E., Garrido, M., Tirard, M., Hsiao, H.-H., Bossis, G., Urlaub, H., Zweckstetter, M., Kügler, S., Melchior, F., Bähr, M., Weishaupt, J.H., 2011. Sumoylation inhibits alpha-synuclein aggregation and toxicity. *J. Cell Biol.* 194, 49–60. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010117>
- Krześlak, A., Lipińska, A., 2004. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9, 305–328.
- Kubo, S., Nemani, V.M., Chalkley, R.J., Anthony, M.D., Hattori, N., Mizuno, Y., Edwards, R.H., Fortin, D.L., 2005. A combinatorial code for the interaction of alpha-synuclein with membranes. *J. Biol. Chem.* 280, 31664–31672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504894200>

- Kumar, A., Kim, J.H., Ranjan, P., Metcalfe, M.G., Cao, W., Mishina, M., Gangappa, S., Guo, Z., Boyden, E.S., Zaki, S., York, I., García-Sastre, A., Shaw, M., Sambhara, S., 2017. Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread. *Sci. Rep.* 7, 40360. <https://doi.org/10.1038/srep40360>
- Künzi, V., Glatzel, M., Nakano, M.Y., Greber, U.F., Van Leuven, F., Aguzzi, A., 2002. Unhindered prion neuroinvasion despite impaired fast axonal transport in transgenic mice overexpressing four-repeat tau. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 7471–7477.
- Kupfer, L., Hinrichs, W., Groschup, M.H., 2009. Prion protein misfolding. *Curr. Mol. Med.* 9, 826–835.
- Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D., 1998. Structure and replication of yeast prions. *Cell* 94, 13–16. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81216-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81216-7)
- Kuwahara, T., Tonegawa, R., Ito, G., Mitani, S., Iwatsubo, T., 2012. Phosphorylation of α -synuclein protein at Ser-129 reduces neuronal dysfunction by lowering its membrane binding property in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 287, 7098–7109. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237131>
- Kuzuhara, S., Mori, H., Izumiyama, N., Yoshimura, M., Ihara, Y., 1988. Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 75, 345–353.
- Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F.J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., Sadoul, R., 2011. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.11.004>
- Langevin, C., Andréoletti, O., Le Dur, A., Laude, H., Béringue, V., 2011. Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* 41, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.09.010>
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., Irwin, I., 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979–980. <https://doi.org/10.1126/science.6823561>
- Larsen, K.E., Schmitz, Y., Troyer, M.D., Mosharov, E., Dietrich, P., Quazi, A.Z., Savalle, M., Nemani, V., Chaudhry, F.A., Edwards, R.H., Stefanis, L., Sulzer, D., 2006. Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 11915–11922. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3821-06.2006>
- Lasmézas, C.I., Deslys, J.P., Robain, O., Jaegly, A., Béringue, V., Peyrin, J.M., Fournier, J.G., Hauw, J.J., Rossier, J., Dormont, D., 1997. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 275, 402–405. <https://doi.org/10.1126/science.275.5298.402>
- Lassus, B., Naudé, J., Faure, P., Guedin, D., Von Boxberg, Y., Mannoury la Cour, C., Millan, M.J., Peyrin, J.-M., 2018a. Glutamatergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuits probed by dynamic calcium imaging of networks reconstructed in microfluidic chips. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35802-9>
- Lassus, B., Naudé, J., Faure, P., Guedin, D., Von Boxberg, Y., Mannoury la Cour, C., Millan, M.J., Peyrin, J.-M., 2018b. Glutamatergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuits probed by dynamic calcium imaging of networks reconstructed in microfluidic chips. *Sci. Rep.* 8, 17461. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35802-9>
- Le Dur, A., Béringue, V., Andréoletti, O., Reine, F., Lai, T.L., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J.-L., Sarradin, P., Benestad, S.L., Laude, H., 2005. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16031–16036. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502296102>
- Le Dur, A., Lai, T.L., Stinnakre, M.-G., Laisné, A., Chenais, N., Rakotobe, S., Passet, B., Reine, F., Soulier, S., Herzog, L., Tilly, G., Rézaei, H., Béringue, V., Vilotte, J.-L., Laude, H., 2017. Divergent prion strain evolution driven by PrPC expression level in transgenic mice. *Nat. Commun.* 8, 14170. <https://doi.org/10.1038/ncomms14170>
- le Feber, J., Postma, W., de Weerd, E., Weusthof, M., Rutten, W.L.C., 2015. Barbed channels enhance unidirectional connectivity between neuronal networks cultured on multi electrode arrays. *Front. Neurosci.* 9, 412. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00412>
- Lebouvier, T., Neunlist, M., Bruley des Varannes, S., Coron, E., Drouard, A., N’Guyen, J.-M., Chaumette, T., Tasselli, M., Paillusson, S., Flamand, M., Galmiche, J.-P., Damier, P., Derkinderen, P., 2010. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson’s disease and its relationship with symptoms. *PloS One* 5, e12728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012728>

- Lee, H.-J., Baek, S.M., Ho, D.-H., Suk, J.-E., Cho, E.-D., Lee, S.-J., 2011. Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. *Exp. Mol. Med.* 43, 216–222. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.4.026>
- Lee, H.-J., Cho, E.-D., Lee, K.W., Kim, J.-H., Cho, S.-G., Lee, S.-J., 2013. Autophagic failure promotes the exocytosis and intercellular transfer of α -synuclein. *Exp. Mol. Med.* 45, e22. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.45>
- Lee, H.-J., Choi, C., Lee, S.-J., 2002. Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J. Biol. Chem.* 277, 671–678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107045200>
- Lee, H.-J., Patel, S., Lee, S.-J., 2005. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 6016–6024. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0692-05.2005>
- Lee, H.-J., Suk, J.-E., Bae, E.-J., Lee, J.-H., Paik, S.R., Lee, S.-J., 2008a. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1835–1849. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.017>
- Lee, H.-J., Suk, J.-E., Bae, E.-J., Lee, S.-J., 2008b. Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.045>
- Lee, H.-J., Suk, J.-E., Patrick, C., Bae, E.-J., Cho, J.-H., Rho, S., Hwang, D., Maslah, E., Lee, S.-J., 2010. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* 285, 9262–9272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081125>
- Lee, J.-G., Takahama, S., Zhang, G., Tomarev, S.I., Ye, Y., 2016. Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 18, 765–776. <https://doi.org/10.1038/ncb3372>
- Lee, M.-H., Siddoway, B., Kaeser, G.E., Segota, I., Rivera, R., Romanow, W.J., Liu, C.S., Park, C., Kennedy, G., Long, T., Chun, J., 2018. Somatic APP gene recombination in Alzheimer's disease and normal neurons. *Nature* 563, 639–645. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0718-6>
- Leftin, A., Job, C., Beyer, K., Brown, M.F., 2013. Solid-state ^{13}C NMR reveals annealing of raft-like membranes containing cholesterol by the intrinsically disordered protein α -Synuclein. *J. Mol. Biol.* 425, 2973–2987. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.04.002>
- Leong, S.L., Pham, C.L.L., Galatis, D., Fodero-Tavoletti, M.T., Perez, K., Hill, A.F., Masters, C.L., Ali, F.E., Barnham, K.J., Cappai, R., 2009. Formation of dopamine-mediated alpha-synuclein-soluble oligomers requires methionine oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1328–1337. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.009>
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P.J., Wilkinson, K.D., Polymeropoulos, M.H., 1998. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395, 451–452. <https://doi.org/10.1038/26652>
- Li, J., Browning, S., Mahal, S.P., Oelschlegel, A.M., Weissmann, C., 2010. Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science* 327, 869–872. <https://doi.org/10.1126/science.1183218>
- Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Björklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., Brundin, P., 2008a. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 14, 501–503. <https://doi.org/10.1038/nm1746>
- Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Björklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., Brundin, P., 2008b. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 14, 501–503. <https://doi.org/10.1038/nm1746>
- Li, W., Hoffman, P.N., Stirling, W., Price, D.L., Lee, M.K., 2004. Axonal transport of human alpha-synuclein slows with aging but is not affected by familial Parkinson's disease-linked mutations. *J. Neurochem.* 88, 401–410. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02166.x>
- Li, W.-W., Yang, R., Guo, J.-C., Ren, H.-M., Zha, X.-L., Cheng, J.-S., Cai, D.-F., 2007. Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport* 18, 1543–1546. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3282f03db4>

- Li, Y., Zhao, C., Luo, F., Liu, Z., Gui, X., Luo, Z., Zhang, X., Li, D., Liu, C., Li, X., 2018. Amyloid fibril structure of α -synuclein determined by cryo-electron microscopy. *Cell Res.* 28, 897–903. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0075-x>
- Liani, E., Eyal, A., Avraham, E., Shemer, R., Szargel, R., Berg, D., Bornemann, A., Riess, O., Ross, C.A., Rott, R., Engelender, S., 2004. Ubiquitylation of synphilin-1 and alpha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5500–5505. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401081101>
- Lin, W.-L., DeLucia, M.W., Dickson, D.W., 2004. Alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions and neurites in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.* 354, 99–102. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.09.075>
- Lindström, V., Gustafsson, G., Sanders, L.H., Howlett, E.H., Sigvardson, J., Kasrayan, A., Ingelsson, M., Bergström, J., Erlandsson, A., 2017. Extensive uptake of α -synuclein oligomers in astrocytes results in sustained intracellular deposits and mitochondrial damage. *Mol. Cell. Neurosci.* 82, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.04.009>
- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., Marsden, C.D., 1990. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247, 574–577. <https://doi.org/10.1126/science.2105529>
- Linsenmeier, L., Altmepfen, H.C., Wetzels, S., Mohammadi, B., Saftig, P., Glatzel, M., 2017. Diverse functions of the prion protein - Does proteolytic processing hold the key? *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864, 2128–2137. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.022>
- Lippa, C.F., Fujiwara, H., Mann, D.M., Giasson, B., Baba, M., Schmidt, M.L., Nee, L.E., O'Connell, B., Pollen, D.A., St George-Hyslop, P., Ghetti, B., Nochlin, D., Bird, T.D., Cairns, N.J., Lee, V.M., Iwatsubo, T., Trojanowski, J.Q., 1998. Lewy bodies contain altered alpha-synuclein in brains of many familial Alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes. *Am. J. Pathol.* 153, 1365–1370. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65722-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65722-7)
- Liu, C.-W., Giasson, B.I., Lewis, K.A., Lee, V.M., Demartino, G.N., Thomas, P.J., 2005. A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation: implications for pathogenesis of Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* 280, 22670–22678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501508200>
- Liu, J., Zhang, J.-P., Shi, M., Quinn, T., Bradner, J., Beyer, R., Chen, S., Zhang, J., 2009. Rab11a and HSP90 regulate recycling of extracellular alpha-synuclein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 1480–1485. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6202-08.2009>
- Liu, J., Zhou, Y., Wang, Y., Fong, H., Murray, T.M., Zhang, J., 2007. Identification of proteins involved in microglial endocytosis of alpha-synuclein. *J. Proteome Res.* 6, 3614–3627. <https://doi.org/10.1021/pr0701512>
- Longair, M.H., Baker, D.A., Armstrong, J.D., 2011. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 2453–2454. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr390>
- Loria, F., Vargas, J.Y., Bousset, L., Syan, S., Salles, A., Melki, R., Zurzolo, C., 2017. α -Synuclein transfer between neurons and astrocytes indicates that astrocytes play a role in degradation rather than in spreading. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 134, 789–808. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1746-2>
- Lotharius, J., Brundin, P., 2002. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 932–942. <https://doi.org/10.1038/nrn983>
- Louis, E.D., Honig, L.S., Vonsattel, J.P.G., Maraganore, D.M., Borden, S., Moskowitz, C.B., 2005. Essential tremor associated with focal nonnigral Lewy bodies: a clinicopathologic study. *Arch. Neurol.* 62, 1004–1007. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.6.1004>
- Lu, M., Sun, W.-L., Shen, J., Wei, M., Chen, B., Qi, Y.-J., Xu, C.-S., 2018. LncRNA-UCA1 promotes PD development by upregulating SNCA. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 7908–7915. https://doi.org/10.26355/eurrev_201811_16417
- Lu, Y., Prudent, M., Fauvet, B., Lashuel, H.A., Girault, H.H., 2011. Phosphorylation of α -Synuclein at Y125 and S129 alters its metal binding properties: implications for understanding the role of α -Synuclein in the pathogenesis of Parkinson's Disease and related disorders. *ACS Chem. Neurosci.* 2, 667–675. <https://doi.org/10.1021/cn200074d>

- 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., Lee, V.M.-Y., 2016. Molecular and Biological Compatibility with Host Alpha-Synuclein Influences Fibril Pathogenicity. *Cell Rep.* 16, 3373–3387. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.053>
- Luk, K.C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2012a. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338, 949–953. <https://doi.org/10.1126/science.1227157>
- Luk, K.C., Kehm, V.M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., 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. <https://doi.org/10.1084/jem.20112457>
- Luk, K.C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J.R., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908005106>
- Luna, E., Decker, S.C., Riddle, D.M., Caputo, A., Zhang, B., Cole, T., Caswell, C., Xie, S.X., Lee, V.M.-Y., Luk, K.C., 2018. Differential α -synuclein expression contributes to selective vulnerability of hippocampal neuron subpopulations to fibril-induced toxicity. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 135, 855–875. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1829-8>
- Lutz, W., Sanderson, W., Scherbov, S., 2008. The coming acceleration of global population ageing. *Nature* 451, 716–719. <https://doi.org/10.1038/nature06516>
- Magalhães, A.C., Baron, G.S., Lee, K.S., Steele-Mortimer, O., Dorward, D., Prado, M.A.M., Caughey, B., 2005. Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 5207–5216. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0653-05.2005>
- Maher, M.P., Dvorak-Carbone, H., Pine, J., Wright, J.A., Tai, Y.C., 1999. Microstructures for studies of cultured neural networks. *Med. Biol. Eng. Comput.* 37, 110–118.
- Mak, S.K., McCormack, A.L., Manning-Bog, A.B., Cuervo, A.M., Di Monte, D.A., 2010. Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J. Biol. Chem.* 285, 13621–13629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074617>
- Maltsev, A.S., Ying, J., Bax, A., 2012. Impact of N-terminal acetylation of α -synuclein on its random coil and lipid binding properties. *Biochemistry* 51, 5004–5013. <https://doi.org/10.1021/bi300642h>
- Manson, J., West, J.D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M.H., Hope, J., 1992. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Dev. Camb. Engl.* 115, 117–122.
- Mao, X., Ou, M.T., Karuppagounder, S.S., Kam, T.-I., Yin, X., Xiong, Y., Ge, P., Umanah, G.E., Brahmachari, S., Shin, J.-H., Kang, H.C., Zhang, J., Xu, J., Chen, R., Park, H., Andrabi, S.A., Kang, S.U., Gonçalves, R.A., Liang, Y., Zhang, S., Qi, C., Lam, S., Keiler, J.A., Tyson, J., Kim, D., Panicker, N., Yun, S.P., Workman, C.J., Vignali, D.A.A., Dawson, V.L., Ko, H.S., Dawson, T.M., 2016. Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* 353. <https://doi.org/10.1126/science.aah3374>
- Maroteaux, L., Campanelli, J.T., Scheller, R.H., 1988. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 8, 2804–2815.
- Marsden, C.D., 1982. Basal ganglia disease. *Lancet Lond. Engl.* 2, 1141–1147. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(82\)92797-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(82)92797-0)
- Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Kubo, M., Shimozawa, A., Akiyama, H., Hasegawa, M., 2014. Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 88. <https://doi.org/10.1186/PREACCEPT-1296467154135944>
- Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D.M.A., Hasegawa, M., 2013. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain net. *Brain J. Neurol.* 136, 1128–1138. <https://doi.org/10.1093/brain/awt037>
- Mawanda, F., Wallace, R., 2013. Can infections cause Alzheimer's disease? *Epidemiol. Rev.* 35, 161–180. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxs007>
- Mazzulli, J.R., Mishizen, A.J., Giasson, B.I., Lynch, D.R., Thomas, S.A., Nakashima, A., Nagatsu, T., Ota, A., Ischiropoulos, H., 2006. Cytosolic catechols inhibit alpha-synuclein aggregation and facilitate the formation of intracellular soluble oligomeric intermediates. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 10068–10078. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0896-06.2006>
- Mbefo, M.K., Paleologou, K.E., Boucharaba, A., Oueslati, A., Schell, H., Fournier, M., Olschewski, D., Yin, G., Zweckstetter, M., Masliah, E., Kahle, P.J., Hirling, H., Lashuel, H.A., 2010. Phosphorylation of synucleins

- by members of the Polo-like kinase family. *J. Biol. Chem.* 285, 2807–2822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081950>
- McConnell, M.J., Lindberg, M.R., Brennand, K.J., Piper, J.C., Voet, T., Cowing-Zitron, C., Shumilina, S., Lasken, R.S., Vermeesch, J.R., Hall, I.M., Gage, F.H., 2013. Mosaic copy number variation in human neurons. *Science* 342, 632–637. <https://doi.org/10.1126/science.1243472>
- McGough, I.J., Vincent, J.-P., 2016. Exosomes in developmental signalling. *Dev. Camb. Engl.* 143, 2482–2493. <https://doi.org/10.1242/dev.126516>
- McKeith, I.G., Dickson, D.W., Lowe, J., Emre, M., O'Brien, J.T., Feldman, H., Cummings, J., Duda, J.E., Lippa, C., Perry, E.K., Aarsland, D., Arai, H., Ballard, C.G., Boeve, B., Burn, D.J., Costa, D., Del Ser, T., Dubois, B., Galasko, D., Gauthier, S., Goetz, C.G., Gomez-Tortosa, E., Halliday, G., Hansen, L.A., Hardy, J., Iwatsubo, T., Kalaria, R.N., Kaufer, D., Kenny, R.A., Korczyn, A., Kosaka, K., Lee, V.M.Y., Lees, A., Litvan, I., Londos, E., Lopez, O.L., Minoshima, S., Mizuno, Y., Molina, J.A., Mukaetova-Ladinska, E.B., Pasquier, F., Perry, R.H., Schulz, J.B., Trojanowski, J.Q., Yamada, M., Consortium on DLB, 2005. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 65, 1863–1872. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000187889.17253.b1>
- McLean, P.J., Kawamata, H., Ribich, S., Hyman, B.T., 2000. Membrane association and protein conformation of alpha-synuclein in intact neurons. Effect of Parkinson's disease-linked mutations. *J. Biol. Chem.* 275, 8812–8816. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8812>
- Mead, S., Stumpf, M.P.H., Whitfield, J., Beck, J.A., Poulter, M., Campbell, T., Uphill, J.B., Goldstein, D., Alpers, M., Fisher, E.M.C., Collinge, J., 2003. Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* 300, 640–643. <https://doi.org/10.1126/science.1083320>
- Melki, R., 2018. How the shapes of seeds can influence pathology. *Neurobiol. Dis.* 109, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.03.011>
- Melnik, B.C., Schmitz, G., 2019. Exosomes of pasteurized milk: potential pathogens of Western diseases. *J. Transl. Med.* 17. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1760-8>
- Mendez, I., Viñuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., Tierney, T., Holness, R., Dagher, A., Trojanowski, J.Q., Isacson, O., 2008. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat. Med.* 14, 507–509. <https://doi.org/10.1038/nm1752>
- Mettenleiter, T.C., 2003. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res.* 92, 197–206.
- Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A.L., Vigouret, J.-M., Paganetti, P., Walsh, D.M., Mathews, P.M., Ghiso, J., Staufenbiel, M., Walker, L.C., Jucker, M., 2006. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313, 1781–1784. <https://doi.org/10.1126/science.1131864>
- Mezey, E., Dehejia, A.M., Harta, G., Tresser, N., Suchy, S.F., Nussbaum, R.L., Brownstein, M.J., Polymeropoulos, M.H., 1998. Alpha synuclein is present in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Mol. Psychiatry* 3, 493–499.
- Middleton, E.R., Rhoades, E., 2010. Effects of curvature and composition on α -synuclein binding to lipid vesicles. *Biophys. J.* 99, 2279–2288. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.07.056>
- Millet, L.J., Gillette, M.U., 2012. Over a Century of Neuron Culture: From the Hanging Drop to Microfluidic Devices. *Yale J. Biol. Med.* 85, 501–521.
- Mollenhauer, B., Trautmann, E., Otte, B., Ng, J., Spreer, A., Lange, P., Sixel-Döring, F., Hakimi, M., Vonsattel, J.-P., Nussbaum, R., Trenkwalder, C., Schlossmacher, M.G., 2012. α -Synuclein in human cerebrospinal fluid is principally derived from neurons of the central nervous system. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 196 119, 739–746. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0784-0>
- Montagu, K.A., 1957. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* 180, 244–245. <https://doi.org/10.1038/180244a0>
- Moore, R.C., Hope, J., McBride, P.A., McConnell, I., Selfridge, J., Melton, D.W., Manson, J.C., 1998. Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat. Genet.* 18, 118–125. <https://doi.org/10.1038/ng0298-118>
- Mori, F., Tanji, K., Yoshimoto, M., Takahashi, H., Wakabayashi, K., 2002. Immunohistochemical comparison of alpha- and beta-synuclein in adult rat central nervous system. *Brain Res.* 941, 118–126. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02643-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02643-4)

- Mougenot, A.-L., Nicot, S., Bencsik, A., Morignat, E., Verchère, J., Lakhdar, L., Legastelois, S., Baron, T., 2012. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* 33, 2225–2228. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.022>
- Moya, K.L., Hässig, R., Créminon, C., Laffont, I., Di Giambardino, L., 2004. Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrPc in peripheral nerve. *J. Neurochem.* 88, 155–160. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02150.x>
- Münch, C., O'Brien, J., Bertolotti, A., 2011. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3548–3553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017275108>
- Münch, G., Lüth, H.J., Wong, A., Arendt, T., Hirsch, E., Ravid, R., Riederer, P., 2000. Crosslinking of alpha-synuclein by advanced glycation endproducts--an early pathophysiological step in Lewy body formation? *J. Chem. Neuroanat.* 20, 253–257.
- Murphy, O., Noel, J., Farrell, M., Lynch, T., 2018. Support for the Spreading Hypothesis: Pathologically Proven Alpha-synuclein Peripheral Neuropathy 20 years Before Development of Parkinsonism (P3.057). *Neurology* 90, P3.057.
- Musah, S., Mammoto, A., Ferrante, T.C., Jeanty, S.S.F., Hirano-Kobayashi, M., Mammoto, T., Roberts, K., Chung, S., Novak, R., Ingram, M., Fatanat-Didar, T., Koshy, S., Weaver, J.C., Church, G.M., Ingber, D.E., 2017. Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip. *Nat. Biomed. Eng.* 1. <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0069>
- Na, S., Kang, M., Bang, S., Park, D., Kim, J., Sim, S.J., Chang, S., Jeon, N.L., 2016. Microfluidic neural axon diode. *TECHNOLOGY* 04, 240–248. <https://doi.org/10.1142/S2339547816500102>
- Nakamura, T., Yamashita, H., Takahashi, T., Nakamura, S., 2001. Activated Fyn phosphorylates alpha-synuclein at tyrosine residue 125. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 1085–1092. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4253>
- Negro, A., Brunati, A.M., Donella-Deana, A., Massimino, M.L., Pinna, L.A., 2002. Multiple phosphorylation of alpha-synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 210–212. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0517fje>
- Nemani, V.M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M.K., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A., Edwards, R.H., 2010. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis. *Neuron* 65, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.023>
- Neumann, C.J., Cohen, S.M., 1997. Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Dev. Camb. Engl.* 124, 871–880.
- Neumann, M., Kahle, P.J., Giasson, B.I., Ozmen, L., Borroni, E., Spooen, W., Müller, V., Odoj, S., Fujiwara, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Trojanowski, J.Q., Kretschmar, H.A., Haass, C., 2002. Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies. *J. Clin. Invest.* 110, 1429–1439. <https://doi.org/10.1172/JCI15777>
- Newman, A.J., Selkoe, D., Dettmer, U., 2013. A new method for quantitative immunoblotting of endogenous α -synuclein. *PLoS One* 8, e81314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081314>
- Ngolab, J., Trinh, I., Rockenstein, E., Mante, M., Florio, J., Trejo, M., Masliah, D., Adame, A., Masliah, E., Rissman, R.A., 2017. Brain-derived exosomes from dementia with Lewy bodies propagate α -synuclein pathology. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 46. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0445-5>
- Nishie, M., Mori, F., Yoshimoto, M., Takahashi, H., Wakabayashi, K., 2004. A quantitative investigation of neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the pontine and inferior olivary nuclei in multiple system atrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30, 546–554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00564.x>
- Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hasegawa, M., 2005. Ubiquitination of alpha-synuclein. *Biochemistry* 44, 361–368. <https://doi.org/10.1021/bi0485528>
- Norrby, E., 2008. Nobel Prizes and the emerging virus concept. *Arch. Virol.* 153, 1109–1123. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0088-8>
- Oelschlegel, A.M., Weissmann, C., 2013. Acquisition of drug resistance and dependence by prions. *PLoS Pathog.* 9, e1003158. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003158>
- Okochi, M., Walter, J., Koyama, A., Nakajo, S., Baba, M., Iwatsubo, T., Meijer, L., Kahle, P.J., Haass, C., 2000. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 275, 390–397. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.390>

- Olefsky, J.M., 1990. The insulin receptor. A multifunctional protein. *Diabetes* 39, 1009–1016. <https://doi.org/10.2337/diab.39.9.1009>
- Ottolini, D., Calí, T., Szabò, I., Brini, M., 2017. Alpha-synuclein at the intracellular and the extracellular side: functional and dysfunctional implications. *Biol. Chem.* 398, 77–100. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0201>
- Oueslati, A., Schneider, B.L., Aebischer, P., Lashuel, H.A., 2013. Polo-like kinase 2 regulates selective autophagic α -synuclein clearance and suppresses its toxicity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3945–3954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309991110>
- Outeiro, T.F., Koss, D.J., Erskine, D., Walker, L., Kurzawa-Akanbi, M., Burn, D., Donaghy, P., Morris, C., Taylor, J.-P., Thomas, A., Attems, J., McKeith, I., 2019. Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Mol. Neurodegener.* 14, 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0306-8>
- Padmaraju, V., Bhaskar, J.J., Prasada Rao, U.J.S., Salimath, P.V., Rao, K.S., 2011. Role of advanced glycation on aggregation and DNA binding properties of α -synuclein. *J. Alzheimers Dis. JAD* 24 Suppl 2, 211–221. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101965>
- Paillusson, S., Clairembault, T., Biraud, M., Neunlist, M., Derkinderen, P., 2013. Activity-dependent secretion of alpha-synuclein by enteric neurons. *J. Neurochem.* 125, 512–517. <https://doi.org/10.1111/jnc.12131>
- Paiva, I., Pinho, R., Pavlou, M.A., Hennion, M., Wales, P., Schütz, A.-L., Rajput, A., Szego, É.M., Kerimoglu, C., Gerhardt, E., Rego, A.C., Fischer, A., Bonn, S., Outeiro, T.F., 2017. Sodium butyrate rescues dopaminergic cells from alpha-synuclein-induced transcriptional deregulation and DNA damage. *Hum. Mol. Genet.* 26, 2231–2246. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx114>
- Paleologou, K.E., Oueslati, A., Shakked, G., Rospigliosi, C.C., Kim, H.-Y., Lamberto, G.R., Fernandez, C.O., Schmid, A., Chegini, F., Gai, W.P., Chiappe, D., Moniatte, M., Schneider, B.L., Aebischer, P., Eliezer, D., Zweckstetter, M., Masliah, E., Lashuel, H.A., 2010. Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 3184–3198. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5922-09.2010>
- Papadopoulos, V.E., Nikolopoulou, G., Antoniadou, I., Karachaliou, A., Arianoglou, G., Emmanouilidou, E., Sardi, S.P., Stefanis, L., Vekrellis, K., 2018. Modulation of β -glucocerebrosidase increases α -synuclein secretion and exosome release in mouse models of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1696–1710. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy075>
- Parkkinen, L., Pirttilä, T., Alafuzoff, I., 2008. Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0346-6>
- Parkkinen, L., Pirttilä, T., Tervahauta, M., Alafuzoff, I., 2005. Widespread and abundant alpha-synuclein pathology in a neurologically unimpaired subject. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 25, 304–314.
- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Pöyhönen, M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024>
- Pathak, D., Berthet, A., Bendor, J.T., Yu, K., Sellnow, R.C., Orr, A.L., Nguyen, M.K., Edwards, R.H., Manfredsson, F.P., Nakamura, K., 2017. Loss of α -Synuclein Does Not Affect Mitochondrial Bioenergetics in Rodent Neurons. *eNeuro* 4. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0216-16.2017>
- Pauling, L., Corey, R.B., 1951. The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 37, 251–256. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.5.251>
- Paumier, K.L., Luk, K.C., Manfredsson, F.P., Kanaan, N.M., Lipton, J.W., Collier, T.J., Steece-Collier, K., Kemp, C.J., Celano, S., Schulz, E., Sandoval, I.M., Fleming, S., Dirr, E., Polinski, N.K., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Sortwell, C.E., 2015. Intrastriatal injection of pre-formed mouse α -synuclein fibrils into rats triggers α -synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. *Neurobiol. Dis.* 82, 185–199. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.06.003>
- Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van den Haute, C., Melki, R., Baekelandt, V., 2015. α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522, 340–344. <https://doi.org/10.1038/nature14547>
- 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., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2018. Cellular milieu imparts distinct pathological α -synuclein strains in α -synucleinopathies. *Nature* 557, 558–563. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0104-4>

- Penrose, L.S., Penrose, R., 1957. A Self-reproducing Analogue. *Nature* 179, 1183–1183. <https://doi.org/10.1038/1791183a0>
- Perissinotti, P.P., Ethington, E.A., Almazan, E., Martínez-Hernández, E., Kalil, J., Koob, M.D., Piedras-Rentería, E.S., 2014. Calcium current homeostasis and synaptic deficits in hippocampal neurons from Kelch-like 1 knockout mice. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 444. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00444>
- Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Mattson, M.P., Yao, P.J., 2018. Invaginating Structures in Mammalian Synapses. *Front. Synaptic Neurosci.* 10, 4. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00004>
- Peyrin, J.-M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., Betuing, S., Pietri, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., Viovy, J.-L., Brugg, B., 2011. Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab. Chip* 11, 3663–3673. <https://doi.org/10.1039/c1lc20014c>
- Piening, N., Weber, P., Giese, A., Kretzschmar, H., 2005. Breakage of PrP aggregates is essential for efficient autocatalytic propagation of misfolded prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.039>
- Pieri, L., Chafey, P., Le Gall, M., Clary, G., Melki, R., Redeker, V., 2016a. Cellular response of human neuroblastoma cells to α -synuclein fibrils, the main constituent of Lewy bodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.007>
- Pieri, L., Madiona, K., Melki, R., 2016b. Structural and functional properties of prefibrillar α -synuclein oligomers. *Sci. Rep.* 6, 24526. <https://doi.org/10.1038/srep24526>
- Polinski, N.K., Volpicelli-Daley, L.A., Sortwell, C.E., Luk, K.C., Cremades, N., Gottler, L.M., Froula, J., Duffy, M.F., Lee, V.M.Y., Martinez, T.N., Dave, K.D., 2018. Best Practices for Generating and Using Alpha-Synuclein Pre-Formed Fibrils to Model Parkinson's Disease in Rodents. *J. Park. Dis.* 8, 303–322. <https://doi.org/10.3233/JPD-171248>
- Polymenidou, M., Stoeck, K., Glatzel, M., Vey, M., Bellon, A., Aguzzi, A., 2005. Coexistence of multiple PrPSc types in individuals with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol.* 4, 805–814. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70225-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70225-8)
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Pranke, I.M., Morello, V., Bigay, J., Gibson, K., Verbavatz, J.-M., Antonny, B., Jackson, C.L., 2011. α -Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding. *J. Cell Biol.* 194, 89–103. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011118>
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T.D.L., 2014. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* 29, 1583–1590. <https://doi.org/10.1002/mds.25945>
- Pronin, A.N., Morris, A.J., Surguchov, A., Benovic, J.L., 2000. Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* 275, 26515–26522. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003542200>
- Proukakis, C., Dudzik, C.G., Brier, T., MacKay, D.S., Cooper, J.M., Millhauser, G.L., Houlden, H., Schapira, A.H., 2013. A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 80, 1062–1064. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828727ba>
- Prusiner, S.B., 1997. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278, 245–251. <https://doi.org/10.1126/science.278.5336.245>
- Prusiner, S.B., 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136–144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
- Prusiner, S.B., Cochran, S.P., Groth, D.F., Downey, D.E., Bowman, K.A., Martinez, H.M., 1982. Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann. Neurol.* 11, 353–358. <https://doi.org/10.1002/ana.410110406>
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F., Glenner, G.G., 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35, 349–358. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90168-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90168-x)
- Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S.L., Serban, D., Carlson, G.A., 1990. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63, 673–686. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90134-z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90134-z)

- Raeber, A.J., Race, R.E., Brandner, S., Priola, S.A., Sailer, A., Bessen, R.A., Mucke, L., Manson, J., Aguzzi, A., Oldstone, M.B., Weissmann, C., Chesebro, B., 1997. Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *EMBO J.* 16, 6057–6065. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.20.6057>
- Ramsay, R.R., Salach, J.I., Singer, T.P., 1986. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD⁺-linked substrates by MPP+. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 743–748. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(86\)80483-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(86)80483-1)
- Ray, S., Singh, N., Pandey, S., Kumar, R., Gadhe, L., Datta, D., Patel, K., Mahato, J., Navalkar, A., Panigrahi, R., Chatterjee, D., Maiti, S., Bhatia, S., Mehra, S., Singh, A., Gerez, J., Chowdhury, A., Kumar, A., Padinhateeri, R., Riek, R., Krishnamoorthy, G., Maji, S.K., 2019. Liquid-liquid phase separation and liquid-to-solid transition mediate α -synuclein amyloid fibril containing hydrogel formation. *bioRxiv* 619858. <https://doi.org/10.1101/619858>
- Rayman, J.B., Kandel, E.R., 2017. Functional Prions in the Brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023671>
- Recasens, A., Dehay, B., Bové, J., Carballo-Carbajal, I., Dovero, S., Pérez-Villalba, A., Fernagut, P.-O., Blesa, J., Parent, A., Perier, C., Fariñas, I., Obeso, J.A., Bezard, E., Vila, M., 2014. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann. Neurol.* 75, 351–362. <https://doi.org/10.1002/ana.24066>
- Regehr, K.J., Domenech, M., Koepsel, J.T., Carver, K.C., Ellison-Zelski, S.J., Murphy, W.L., Schuler, L.A., Alarid, E.T., Beebe, D.J., 2009. Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. *Lab. Chip* 9, 2132–2139. <https://doi.org/10.1039/b903043c>
- Renault, R., Durand, J.-B., Viovy, J.-L., Villard, C., 2016. Asymmetric axonal edge guidance: a new paradigm for building oriented neuronal networks. *Lab. Chip* 16, 2188–2191. <https://doi.org/10.1039/c6lc00479b>
- Renault, R., Sukenik, N., Descroix, S., Malaquin, L., Viovy, J.-L., Peyrin, J.-M., Bottani, S., Monceau, P., Moses, E., Vignes, M., 2015. Combining Microfluidics, Optogenetics and Calcium Imaging to Study Neuronal Communication In Vitro. *PLOS ONE* 10, e0120680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120680>
- Rey, N.L., George, S., Steiner, J.A., Madaj, Z., Luk, K.C., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Brundin, P., 2018. Spread of aggregates after olfactory bulb injection of α -synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 135, 65–83. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1792-9>
- Rey, N.L., Petit, G.H., Bousset, L., Melki, R., Brundin, P., 2013. Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 555–573. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1160-3>
- Rey, N.L., Steiner, J.A., Maroof, N., Luk, K.C., Madaj, Z., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Brundin, P., 2016. Widespread transneuronal propagation of α -synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *J. Exp. Med.* 213, 1759–1778. <https://doi.org/10.1084/jem.20160368>
- Reyes, J.F., Olsson, T.T., Lamberts, J.T., Devine, M.J., Kunath, T., Brundin, P., 2015. A cell culture model for monitoring α -synuclein cell-to-cell transfer. *Neurobiol. Dis.* 77, 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.07.003>
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., Wüthrich, K., 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382, 180–182. <https://doi.org/10.1038/382180a0>
- Riesner, D., 2003. Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). *Br. Med. Bull.* 66, 21–33. <https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.21>
- Rietdijk, C.D., Perez-Pardo, P., Garssen, J., van Wezel, R.J.A., Kraneveld, A.D., 2017. Exploring Braak's Hypothesis of Parkinson's Disease. *Front. Neurol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00037>
- Roberts, R.F., Wade-Martins, R., Alegre-Abarrategui, J., 2015. Direct visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain. *Brain J. Neurol.* 138, 1642–1657. <https://doi.org/10.1093/brain/awv040>
- Rokad, D., Ghaisas, S., Harischandra, D.S., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A., Kanthasamy, A.G., 2017. Role of neurotoxicants and traumatic brain injury in α -synuclein protein misfolding and aggregation. *Brain Res. Bull.* 133, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.003>
- Roth, S., Bugnicourt, G., Bisbal, M., Gory-Fauré, S., Brocard, J., Villard, C., 2012. Neuronal architectures with axo-dendritic polarity above silicon nanowires. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 8, 671–675. <https://doi.org/10.1002/sml.201102325>

- Rott, R., Szargel, R., Haskin, J., Shani, V., Shainskaya, A., Manov, I., Liani, E., Avraham, E., Engelender, S., 2008. Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells. *J. Biol. Chem.* 283, 3316–3328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704809200>
- Rott, R., Szargel, R., Shani, V., Hamza, H., Savyon, M., Abd Elghani, F., Bandopadhyay, R., Engelender, S., 2017. SUMOylation and ubiquitination reciprocally regulate α -synuclein degradation and pathological aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 13176–13181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704351114>
- Roy, S., Winton, M.J., Black, M.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2008. Cytoskeletal requirements in axonal transport of slow component-b. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5248–5256. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0309-08.2008>
- Roy, S., Winton, M.J., Black, M.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2007. Rapid and intermittent cotransport of slow component-b proteins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 3131–3138. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4999-06.2007>
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., Gerdes, H.-H., 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303, 1007–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1093133>
- Saborio, G.P., Permanne, B., Soto, C., 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810–813. <https://doi.org/10.1038/35081095>
- Saborío, G.P., Soto, C., Kacsak, R.J., Levy, E., Kacsak, R., Harris, D.A., Frangione, B., 1999. Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 470–475. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0660>
- Sacino, A.N., Ayers, J.I., Brooks, M.M.T., Chakrabarty, P., Hudson, V.J., Howard, J.K., Golde, T.E., Giasson, B.I., Borchelt, D.R., 2016. Non-prion-type transmission in A53T α -synuclein transgenic mice: a normal component of spinal homogenates from naïve non-transgenic mice induces robust α -synuclein pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 151–154. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1505-1>
- Sacino, A.N., Brooks, M., McKinney, A.B., Thomas, M.A., Shaw, G., Golde, T.E., Giasson, B.I., 2014a. Brain injection of α -synuclein induces multiple proteinopathies, gliosis, and a neuronal injury marker. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 12368–12378. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2102-14.2014>
- 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., Golde, T.E., Giasson, B.I., 2014b. Intramuscular injection of α -synuclein induces CNS α -synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 10732–10737. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321785111>
- 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., Giasson, B.I., 2014c. Amyloidogenic α -synuclein seeds do not invariably induce rapid, widespread pathology in mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 127, 645–665. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1268-0>
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., 1998. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* 4, 1157–1165. <https://doi.org/10.1038/2654>
- Sambashivan, S., Liu, Y., Sawaya, M.R., Gingery, M., Eisenberg, D., 2005. Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure. *Nature* 437, 266–269. <https://doi.org/10.1038/nature03916>
- Sampey, G.C., Meyering, S.S., Zadeh, M.A., Saifuddin, M., Hakami, R.M., Kashanchi, F., 2014. Exosomes and their role in CNS viral infections. *J. Neurovirol.* 20, 199–208. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0238-6>
- Sandberg, M.K., Al-Doujaily, H., Sharps, B., Clarke, A.R., Collinge, J., 2011. Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature* 470, 540–542. <https://doi.org/10.1038/nature09768>
- Sang, J.C., Meisl, G., Thackray, A.M., Hong, L., Ponjavic, A., Knowles, T.P.J., Bujdoso, R., Klenerman, D., 2018. Direct Observation of Murine Prion Protein Replication in Vitro. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 14789–14798. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08311>
- Sano, I., Gamo, T., Kakimoto, Y., Taniguchi, K., Takesada, M., Nishinuma, K., 1959. Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochim. Biophys. Acta* 32, 586–587. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(59\)90652-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90652-3)
- Schapira, A.H.V., Tolosa, E., 2010. Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 309–317. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.52>
- Scheperjans, F., 2018. The prodromal microbiome. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 33, 5–7. <https://doi.org/10.1002/mds.27197>

- Schilling, S., Mehr, A., Ludewig, S., Stephan, J., Zimmermann, M., August, A., Strecker, P., Korte, M., Koo, E.H., Müller, U.C., Kins, S., Eggert, S., 2017. APLP1 Is a Synaptic Cell Adhesion Molecule, Supporting Maintenance of Dendritic Spines and Basal Synaptic Transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 5345–5365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1875-16.2017>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidt, C., Fizet, J., Properzi, F., Batchelor, M., Sandberg, M.K., Edgeworth, J.A., Afran, L., Ho, S., Badhan, A., Klier, S., Linehan, J.M., Brandner, S., Hosszu, L.L.P., Tattum, M.H., Jat, P., Clarke, A.R., Klöhn, P.C., Wadsworth, J.D.F., Jackson, G.S., Collinge, J., 2015. A systematic investigation of production of synthetic prions from recombinant prion protein. *Open Biol.* 5, 150165. <https://doi.org/10.1098/rsob.150165>
- Schonberger, O., Horonchik, L., Gabizon, R., Papy-Garcia, D., Barrिताult, D., Taraboulos, A., 2003. Novel heparan mimetics potentially inhibit the scrapie prion protein and its endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.150>
- Scott, M., Foster, D., Miranda, C., Serban, D., Coufal, F., Wälchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S.J., Westaway, D., Prusiner, S.B., 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59, 847–857. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90608-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90608-9)
- Seeburg, D.P., Sheng, M., 2008. Activity-induced Polo-like kinase 2 is required for homeostatic plasticity of hippocampal neurons during epileptiform activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 6583–6591. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1853-08.2008>
- Senior, S.L., Ninkina, N., Deacon, R., Bannerman, D., Buchman, V.L., Cragg, S.J., Wade-Martins, R., 2008. Increased striatal dopamine release and hyperdopaminergic-like behaviour in mice lacking both alpha-synuclein and gamma-synuclein. *Eur. J. Neurosci.* 27, 947–957. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06055.x>
- Serpell, L.C., Berriman, J., Jakes, R., Goedert, M., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4897>
- Shahmoradian, S.H., Lewis, A.J., Genoud, C., Graff-Meyer, A., Hench, J., Moors, T., Schweighauser, G., Wang, J., Goldie, K.N., Suetterlin, R., Castano-Diez, D., Perez-Navarro, P., Huisman, E., Ipsen, S., Ingrassia, A., Gier, Y. de, Rozemuller, A.J.M., Paepe, A.D., Erny, J., Staempfli, A., Hoernschemeyer, J., Grosserueschkamp, F., Niedieker, D., El-Mashtoly, S.F., Quadri, M., IJcken, W.F.J. van, Bonifati, V., Gerwert, K., Bohrmann, B., Frank, S., Britschgi, M., Stahlberg, H., Berg, W. van de, Lauer, M.E., 2019a. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of a crowded organellar, membranous medley. *bioRxiv* 137976. <https://doi.org/10.1101/137976>
- Shahmoradian, S.H., Lewis, A.J., Genoud, C., Hench, J., Moors, T.E., Navarro, P.P., Castaño-Díez, D., Schweighauser, G., Graff-Meyer, A., Goldie, K.N., Sütterlin, R., Huisman, E., Ingrassia, A., Gier, Y. de, Rozemuller, A.J.M., Wang, J., Paepe, A.D., Erny, J., Staempfli, A., Hoernschemeyer, J., Großerüschkamp, F., Niedieker, D., El-Mashtoly, S.F., Quadri, M., Van IJcken, W.F.J., Bonifati, V., Gerwert, K., Bohrmann, B., Frank, S., Britschgi, M., Stahlberg, H., Van de Berg, W.D.J., Lauer, M.E., 2019b. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat. Neurosci.* 22, 1099–1109. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0423-2>
- Shahpasandzadeh, H., Popova, B., Kleinknecht, A., Fraser, P.E., Outeiro, T.F., Braus, G.H., 2014. Interplay between sumoylation and phosphorylation for protection against α -synuclein inclusions. *J. Biol. Chem.* 289, 31224–31240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.559237>
- Shaikh, S., Nicholson, L.F.B., 2008. Advanced glycation end products induce in vitro cross-linking of alpha-synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation. *J. Neurosci. Res.* 86, 2071–2082. <https://doi.org/10.1002/jnr.21644>
- Shannon, K.M., Keshavarzian, A., Mutlu, E., Dodiya, H.B., Daian, D., Jaglin, J.A., Kordower, J.H., 2012. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 27, 709–715. <https://doi.org/10.1002/mds.23838>

- Sharon, R., Goldberg, M.S., Bar-Josef, I., Betensky, R.A., Shen, J., Selkoe, D.J., 2001. α -Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9110–9115. <https://doi.org/10.1073/pnas.171300598>
- Sheng, M., Hoogenraad, C.C., 2007. The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823–847. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029>
- Shimozawa, A., Ono, M., Takahara, D., Tarutani, A., Imura, S., Masuda-Suzukake, M., Higuchi, M., Yanai, K., Hisanaga, S.-I., Hasegawa, M., 2017. Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 12. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0413-0>
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S. i, Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, T., 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302–305. <https://doi.org/10.1038/77060>
- Shrivastava, A.N., Redeker, V., Fritz, N., Pieri, L., Almeida, L.G., Spolidoro, M., Liebmann, T., Bousset, L., Renner, M., Léna, C., Aperia, A., Melki, R., Triller, A., 2016. Data in support of the identification of neuronal and astrocyte proteins interacting with extracellularly applied oligomeric and fibrillar α -synuclein assemblies by mass spectrometry. *Data Brief* 7, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.02.018>
- Shrivastava, A.N., Redeker, V., Fritz, N., Pieri, L., Almeida, L.G., Spolidoro, M., Liebmann, T., Bousset, L., Renner, M., Léna, C., Aperia, A., Melki, R., Triller, A., 2015. α -synuclein assemblies sequester neuronal α 3-Na⁺/K⁺-ATPase and impair Na⁺ gradient. *EMBO J.* 34, 2408–2423. <https://doi.org/10.15252/embj.201591397>
- Si, K., Choi, Y.-B., White-Grindley, E., Majumdar, A., Kandel, E.R., 2010. Aplysia CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation. *Cell* 140, 421–435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.008>
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M.R., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy, K., 2003. α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841. <https://doi.org/10.1126/science.1090278>
- Sisó, S., Jeffrey, M., González, L., 2010. Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 120, 689–705. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0743-5>
- Sklerov, M., Division of Movement Disorders, Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, US, Waters, C., Division of Movement Disorders, Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, US, 2016. Understanding Multiple System Atrophy—Could Genetics Lead the Way? *US Neurol.* 12, 110. <https://doi.org/10.17925/USN.2016.12.02.110>
- Sousa, V.L., Bellani, S., Giannandrea, M., Yousuf, M., Valtorta, F., Meldolesi, J., Chierigatti, E., 2009. α -Synuclein and Its A30P Mutant Affect Actin Cytoskeletal Structure and Dynamics. *Mol. Biol. Cell* 20, 3725–3739. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-03-0302>
- Spacek, J., Harris, K.M., 2004. Trans-endocytosis via spinules in adult rat hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4233–4241. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0287-04.2004>
- Specht, C.G., Schoepfer, R., 2001. Deletion of the α -synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci.* 2, 11.
- Spencer, B., Valera, E., Rockenstein, E., Trejo-Morales, M., Adame, A., Masliah, E., 2015. A brain-targeted, modified neurosin (kallikrein-6) reduces α -synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy. *Mol. Neurodegener.* 10, 48. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0043-6>
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M., 1998. α -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. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6469>
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Squire, L.R. (Ed.), 2009. *Encyclopedia of neuroscience*. Elsevier, Acad. Press, Amsterdam.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., Prusiner, S.B., 1987. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229–240. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90150-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90150-4)
- Stanley, W.M., 1935. ISOLATION OF A CRYSTALLINE PROTEIN POSSESSING THE PROPERTIES OF TOBACCO-MOSAIC VIRUS. *Science* 81, 644–645. <https://doi.org/10.1126/science.81.2113.644>

- Stenger, D.A., Hickman, J.J., Bateman, K.E., Ravenscroft, M.S., Ma, W., Pancrazio, J.J., Shaffer, K., Schaffner, A.E., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., 1998. Microlithographic determination of axonal/dendritic polarity in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Methods* 82, 167–173.
- Stolzenberg, E., Berry, D., Yang, D., Lee, E.Y., Kroemer, A., Kaufman, S., Wong, G.C.L., Oppenheim, J.J., Sen, S., Fishbein, T., Bax, A., Harris, B., Barbut, D., Zasloff, M.A., 2017. A Role for Neuronal Alpha-Synuclein in Gastrointestinal Immunity. *J. Innate Immun.* 9, 456–463. <https://doi.org/10.1159/000477990>
- Stopschinski, B.E., Holmes, B.B., Miller, G.M., Manon, V.A., Vaquer-Alicea, J., Prueitt, W.L., Hsieh-Wilson, L.C., Diamond, M.I., 2018. Specific glycosaminoglycan chain length and sulfation patterns are required for cell uptake of tau versus α -synuclein and β -amyloid aggregates. *J. Biol. Chem.* 293, 10826–10840. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000378>
- Stuendl, A., Kunadt, M., Kruse, N., Bartels, C., Moebius, W., Danzer, K.M., Mollenhauer, B., Schneider, A., 2016. Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain J. Neurol.* 139, 481–494. <https://doi.org/10.1093/brain/awv346>
- Stykel, M.G., Humphries, K., Kirby, M.P., Czaniecki, C., Wang, T., Ryan, T., Bamm, V., Ryan, S.D., 2018. Nitration of microtubules blocks axonal mitochondrial transport in a human pluripotent stem cell model of Parkinson's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 5350–5364. <https://doi.org/10.1096/fj.201700759RR>
- Südhof, T.C., 2017. Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell* 171, 745–769. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.024>
- Surmeier, D.J., Obeso, J.A., Halliday, G.M., 2017. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 101–113. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.178>
- Sveinbjornsdottir, S., 2016. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 139 Suppl 1, 318–324. <https://doi.org/10.1111/jnc.13691>
- Taguchi, K., Watanabe, Y., Tsujimura, A., Tanaka, M., 2018. Expression of α -synuclein is regulated in a neuronal cell type-dependent manner. *Anat. Sci. Int.* <https://doi.org/10.1007/s12565-018-0464-8>
- Taguchi, K., Watanabe, Y., Tsujimura, A., Tanaka, M., 2016. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J. Comp. Neurol.* 524, 1236–1258. <https://doi.org/10.1002/cne.23901>
- Taguchi, K., Watanabe, Y., Tsujimura, A., Tatebe, H., Miyata, S., Tokuda, T., Mizuno, T., Tanaka, M., 2014. Differential expression of alpha-synuclein in hippocampal neurons. *PloS One* 9, e89327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089327>
- Takakura, I., Miyazawa, K., Kanaya, T., Itani, W., Watanabe, K., Ohwada, S., Watanabe, H., Hondo, T., Rose, M.T., Mori, T., Sakaguchi, S., Nishida, N., Katamine, S., Yamaguchi, T., Aso, H., 2011. Orally administered prion protein is incorporated by m cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice. *Am. J. Pathol.* 179, 1301–1309. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.058>
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., Jahn, R., 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127, 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>
- Tanaka, M., Collins, S.R., Toyama, B.H., Weissman, J.S., 2006. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 442, 585–589. <https://doi.org/10.1038/nature04922>
- Tang, Y., Das, U., Scott, D.A., Roy, S., 2012. The slow axonal transport of alpha-synuclein--mechanistic commonalities amongst diverse cytosolic cargoes. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 69, 506–513. <https://doi.org/10.1002/cm.21019>
- Tanik, S.A., Schultheiss, C.E., Volpicelli-Daley, L.A., Brunden, K.R., Lee, V.M.Y., 2013. Lewy body-like α -synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *J. Biol. Chem.* 288, 15194–15210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457408>
- Tanji, K., Mori, F., Imaizumi, T., Yoshida, H., Matsumiya, T., Tamo, W., Yoshimoto, M., Odagiri, H., Sasaki, M., Takahashi, H., Satoh, K., Wakabayashi, K., 2002. Upregulation of alpha-synuclein by lipopolysaccharide and interleukin-1 in human macrophages. *Pathol. Int.* 52, 572–577.
- Tatebe, H., Watanabe, Y., Kasai, T., Mizuno, T., Nakagawa, M., Tanaka, M., Tokuda, T., 2010. Extracellular neurosin degrades α -synuclein in cultured cells. *Neurosci. Res.* 67, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2010.04.008>

- Taylor, A.M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., Jeon, N.L., 2005. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods* 2, 599–605. <https://doi.org/10.1038/nmeth777>
- Taylor, A.M., Dieterich, D.C., Ito, H.T., Kim, S.A., Schuman, E.M., 2010. Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. *Neuron* 66, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.022>
- Taylor, A.M., Rhee, S.W., Tu, C.H., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., Jeon, N.L., 2003. Microfluidic Multicompartment Device for Neuroscience Research. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 19, 1551–1556. <https://doi.org/10.1021/la026417v>
- Taylor, D., 2002. Inactivation of the BSE agent. *C. R. Biol.* 325, 75–76.
- Taylor, D.M., Fernie, K., McConnell, I., Steele, P.J., 1998. Observations on thermostable subpopulations of the unconventional agents that cause transmissible degenerative encephalopathies. *Vet. Microbiol.* 64, 33–38.
- Terry, C., Wenborn, A., Gros, N., Sells, J., Joiner, S., Hosszu, L.L.P., Tattum, M.H., Panico, S., Clare, D.K., Collinge, J., Saibil, H.R., Wadsworth, J.D.F., 2016. Ex vivo mammalian prions are formed of paired double helical prion protein fibrils. *Open Biol.* 6. <https://doi.org/10.1098/rsob.160035>
- Theillet, F.-X., Binolfi, A., Bekei, B., Martorana, A., Rose, H.M., Stuver, M., Verzini, S., Lorenz, D., van Rossum, M., Goldfarb, D., Selenko, P., 2016. Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* 530, 45–50. <https://doi.org/10.1038/nature16531>
- Thomas, B., Beal, M.F., 2007. Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 16 Spec No. 2, R183-194. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm159>
- Thomas D. Brock, n.d. Milestones in Microbiology.
- Timpl, R., Engel, J., Martin, G.R., 1983. Laminin — a multifunctional protein of basement membranes. *Trends Biochem. Sci.* 8, 207–209. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(83\)90213-X](https://doi.org/10.1016/0968-0004(83)90213-X)
- Tixador, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Chapuis, J., Le Dur, A., Laude, H., Béringue, V., 2010. The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathog.* 6, e1000859. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000859>
- Tojima, T., Kamiguchi, H., 2015. Exocytic and endocytic membrane trafficking in axon development. *Dev. Growth Differ.* 57, 291–304. <https://doi.org/10.1111/dgd.12218>
- Tomba, C., Brañi, C., Wu, B., Gov, N.S., Villard, C., 2014. Tuning the adhesive geometry of neurons: length and polarity control. *Soft Matter* 10, 2381–2387. <https://doi.org/10.1039/C3SM52342J>
- Tomlinson, P.R., Zheng, Y., Fischer, R., Heidasch, R., Gardiner, C., Evetts, S., Hu, M., Wade-Martins, R., Turner, M.R., Morris, J., Talbot, K., Kessler, B.M., Tofaris, G.K., 2015. Identification of distinct circulating exosomes in Parkinson's disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2, 353–361. <https://doi.org/10.1002/acn3.175>
- Tran, H.T., Chung, C.H.-Y., Iba, M., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Luk, K.C., Lee, V.M.Y., 2014. α -Synuclein Immunotherapy Blocks Uptake and Templated Propagation of Misfolded α -Synuclein and Neurodegeneration. *Cell Rep.* 7, 2054–2065. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.033>
- Tsemekhman, K., Goldschmidt, L., Eisenberg, D., Baker, D., 2007. Cooperative hydrogen bonding in amyloid formation. *Protein Sci.* 16, 761–764. <https://doi.org/10.1110/ps.062609607>
- Uchihara, T., 2017. An order in Lewy body disorders: Retrograde degeneration in hyperbranching axons as a fundamental structural template accounting for focal/multifocal Lewy body disease. *Neuropathology* 37, 129–149. <https://doi.org/10.1111/neup.12348>
- Uchihara, T., Giasson, B.I., 2016. Propagation of alpha-synuclein pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 49–73. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1485-1>
- Uéda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D.A., Kondo, J., Ihara, Y., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11282>
- Ugolini, G., 2008. Use of rabies virus as a transneuronal tracer of neuronal connections: implications for the understanding of rabies pathogenesis. *Dev. Biol.* 131, 493–506.
- Ugolini, G., 1995. Specificity of rabies virus as a transneuronal tracer of motor networks: transfer from hypoglossal motoneurons to connected second-order and higher order central nervous system cell groups. *J. Comp. Neurol.* 356, 457–480. <https://doi.org/10.1002/cne.903560312>

- Ulmer, T.S., Bax, A., Cole, N.B., Nussbaum, R.L., 2005. Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 280, 9595–9603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411805200>
- Ulusoy, A., Musgrove, R.E., Rusconi, R., Klinkenberg, M., Helwig, M., Schneider, A., Di Monte, D.A., 2015. Neuron-to-neuron α -synuclein propagation in vivo is independent of neuronal injury. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 13. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0198-y>
- Uversky, V.N., 2017. Looking at the recent advances in understanding α -synuclein and its aggregation through the proteoform prism. *F1000Research* 6, 525. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10536.1>
- Uversky, V.N., Li, J., Fink, A.L., 2001a. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 500, 105–108. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02597-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02597-2)
- Uversky, V.N., Li, J., Fink, A.L., 2001b. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J. Biol. Chem.* 276, 44284–44296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105343200>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Valera, E., Masliah, E., 2018. The neuropathology of multiple system atrophy and its therapeutic implications. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 211, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.11.002>
- van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., Raposo, G., 2006. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J. Biochem. (Tokyo)* 140, 13–21. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj128>
- Van Pottelsberghe, C., Rammohan, K.W., McFarland, H.F., Dubois-Dalcq, M., 1979. Selective neuronal, dendritic, and postsynaptic localization of viral antigen in measles-infected mice. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 40, 99–108.
- Vasili, E., Dominguez-Mejide, A., Outeiro, T.F., 2019. Spreading of α -Synuclein and Tau: A Systematic Comparison of the Mechanisms Involved. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 107. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00107>
- Vázquez-Fernández, E., Vos, M.R., Afanasyev, P., Cebeý, L., Sevillano, A.M., Vidal, E., Rosa, I., Renault, L., Ramos, A., Peters, P.J., Fernández, J.J., van Heel, M., Young, H.S., Requena, J.R., Wille, H., 2016a. The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLoS Pathog.* 12, e1005835. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005835>
- Vázquez-Fernández, E., Vos, M.R., Afanasyev, P., Cebeý, L., Sevillano, A.M., Vidal, E., Rosa, I., Renault, L., Ramos, A., Peters, P.J., Fernández, J.J., van Heel, M., Young, H.S., Requena, J.R., Wille, H., 2016b. The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLoS Pathog.* 12, e1005835. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005835>
- Vicario, M., Cieri, D., Brini, M., Calì, T., 2018. The Close Encounter Between Alpha-Synuclein and Mitochondria. *Front. Neurosci.* 12, 388. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00388>
- Vicente Miranda, H., Cássio, R., Correia-Guedes, L., Gomes, M.A., Chegão, A., Miranda, E., Soares, T., Coelho, M., Rosa, M.M., Ferreira, J.J., Outeiro, T.F., 2017. Posttranslational modifications of blood-derived alpha-synuclein as biochemical markers for Parkinson's disease. *Sci. Rep.* 7, 13713. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14175-5>
- Vickery, C.M., Beck, K.E., Simmons, M.M., Hawkins, S.A.C., Spiropoulos, J., 2013. Disease characteristics of bovine spongiform encephalopathy following inoculation into mice via three different routes. *Int. J. Exp. Pathol.* 94, 320–328. <https://doi.org/10.1111/iep.12036>
- Virchow, R.L.K., 1863. Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology ... Philadelphia : J. B. Lippincott.
- Virlogeux, A., Moutaux, E., Christaller, W., Genoux, A., Bruyère, J., Fino, E., Charlot, B., Cazorla, M., Saudou, F., 2018. Reconstituting Corticostriatal Network on-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington's Disease. *Cell Rep.* 22, 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.013>
- Volles, M.J., Lansbury, P.T., 2002. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* 41, 4595–4602. <https://doi.org/10.1021/bi0121353>
- Volles, M.J., Lee, S.J., Rochet, J.C., Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Kessler, J.C., Lansbury, P.T., 2001. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 40, 7812–7819. <https://doi.org/10.1021/bi0102398>

- Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., Lee, V.M.-Y., 2014. Addition of exogenous α -synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous α -synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat. Protoc.* 9, 2135–2146. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.143>
- Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., Patel, T.P., Tanik, S.A., Riddle, D.M., Stieber, A., Meaney, D.F., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2011. Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 72, 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.033>
- von Campenhausen, S., Bornschein, B., Wick, R., Bötzel, K., Sampaio, C., Poewe, W., Oertel, W., Siebert, U., Berger, K., Dodel, R., 2005. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 15, 473–490. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.04.007>
- Wadsworth, J.D.F., Asante, E.A., Desbruslais, M., Linehan, J.M., Joiner, S., Gowland, I., Welch, J., Stone, L., Lloyd, S.E., Hill, A.F., Brandner, S., Collinge, J., 2004. Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. *Science* 306, 1793–1796. <https://doi.org/10.1126/science.1103932>
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Ohama, E., Ikuta, F., 1990. Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 79, 581–583. <https://doi.org/10.1007/BF00294234>
- Walker, L.C., Jucker, M., 2015. Neurodegenerative diseases: expanding the prion concept. *Annu. Rev. Neurosci.* 38, 87–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033828>
- Wang, F., Wang, X., Yuan, C.-G., Ma, J., 2010. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327, 1132–1135. <https://doi.org/10.1126/science.1183748>
- Wang, L., Maji, S.K., Sawaya, M.R., Eisenberg, D., Riek, R., 2008. Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure. *PLoS Biol.* 6, e195. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060195>
- Wang, X., Gerdes, H.-H., 2015. Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ.* 22, 1181–1191. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.211>
- Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Krüger, L., Irsen, S., Tepper, K., Chandupatla, R., Maetzler, W., Schneider, A., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M., 2017. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol. Neurodegener.* 12, 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>
- Wang, Y.-M., Pu, P., Le, W.-D., 2007. ATP depletion is the major cause of MPP+ induced dopamine neuronal death and worm lethality in alpha-synuclein transgenic *C. elegans*. *Neurosci. Bull.* 23, 329–335. <https://doi.org/10.1007/s12264-007-0049-3>
- Wang, Z., Udeshi, N.D., O'Malley, M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hart, G.W., 2010. Enrichment and site mapping of O-linked N-acetylglucosamine by a combination of chemical/enzymatic tagging, photochemical cleavage, and electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 153–160. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900268-MCP200>
- Watson, J.D., Crick, F.H., 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- Watts, J.C., Giles, K., Oehler, A., Middleton, L., Dexter, D.T., Gentleman, S.M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., 2013. Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 19555–19560. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318268110>
- Waxman, E.A., Giasson, B.I., 2008. Specificity and regulation of casein kinase-mediated phosphorylation of alpha-synuclein. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 402–416. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31816fc995>
- Weibel, D.B., Whitesides, G.M., 2006. Applications of microfluidics in chemical biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 584–591. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.016>
- Westaway, D., Goodman, P.A., Miranda, C.A., McKinley, M.P., Carlson, G.A., Prusiner, S.B., 1987. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51, 651–662. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90134-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90134-6)
- Weydert, S., Zürcher, S., Tanner, S., Zhang, N., Ritter, R., Peter, T., Aebbersold, M.J., Thompson-Steckel, G., Forró, C., Rottmar, M., Stauffer, F., Valassina, I.A., Morgese, G., Benetti, E.M., Tosatti, S., Vörös, J., 2017. Easy to Apply Polyoxazoline-Based Coating for Precise and Long-Term Control of Neural Patterns. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 33, 8594–8605. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01437>
- Wickner, R.B., Shewmaker, F., Edsles, H., Kryndushkin, D., Nemecek, J., McGlinchey, R., Bateman, D., Winchester, C.-L., 2010. Prion amyloid structure explains templating: how proteins can be genes. *FEMS Yeast Res.* 10, 980–991. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00666.x>

- Wille, H., Requena, J.R., 2018. The Structure of PrPSc Prions. *Pathog. Basel Switz.* 7. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010020>
- Williams, D.R., Litvan, I., 2013. Parkinsonian syndromes. *Contin. Minneap. Minn* 19, 1189–1212. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000436152.24038.e0>
- Wills, Z.P., Mandel-Brehm, C., Mardinly, A.R., McCord, A.E., Giger, R.J., Greenberg, M.E., 2012. The nogo receptor family restricts synapse number in the developing hippocampus. *Neuron* 73, 466–481. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.029>
- Wiltzius, J.J.W., Landau, M., Nelson, R., Sawaya, M.R., Apostol, M.I., Goldschmidt, L., Soriaga, A.B., Cascio, D., Rajashankar, K., Eisenberg, D., 2009. Molecular mechanisms for protein-encoded inheritance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 973–978. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1643>
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F.H., Riek, R., 2011. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4194–4199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100976108>
- Withers, G.S., George, J.M., Banker, G.A., Clayton, D.F., 1997. Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 99, 87–94.
- Woerman, A.L., Oehler, A., Kazmi, S.A., Lee, J., Halliday, G.M., Middleton, L.T., Gentleman, S.M., Mordes, D.A., Spina, S., Grinberg, L.T., Olson, S.H., Prusiner, S.B., 2019. Multiple system atrophy prions retain strain specificity after serial propagation in two different Tg(SNCA*A53T) mouse lines. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 137, 437–454. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01959-4>
- Wood, S.J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J.C., Citron, M., Biere, A.L., 1999. alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* 274, 19509–19512.
- Wright, P.E., Dyson, H.J., 2015. Intrinsically Disordered Proteins in Cellular Signaling and Regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 18–29. <https://doi.org/10.1038/nrm3920>
- Wu, K.-P., Kim, S., Fela, D.A., Baum, J., 2008. Characterization of conformational and dynamic properties of natively unfolded human and mouse alpha-synuclein ensembles by NMR: implication for aggregation. *J. Mol. Biol.* 378, 1104–1115. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.017>
- Wu, Q., Takano, H., Riddle, D.M., Trojanowski, J.Q., Coulter, D.A., Lee, V.M.-Y., 2019. α -Synuclein (α Syn) Preformed Fibrils Induce Endogenous α Syn Aggregation, Compromise Synaptic Activity and Enhance Synapse Loss in Cultured Excitatory Hippocampal Neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 39, 5080–5094. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0060-19.2019>
- Wulf, M.-A., Senatore, A., Aguzzi, A., 2017. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0375-5>
- Wyart, C., Ybert, C., Bourdieu, L., Herr, C., Prinz, C., Chatenay, D., 2002. Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces. *J. Neurosci. Methods* 117, 123–131.
- Xia, Y., Whitesides, G.M., 1998. Soft Lithography. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 37, 550–575. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980316\)37:5<550::AID-ANIE550>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980316)37:5<550::AID-ANIE550>3.0.CO;2-G)
- Xia, Y., Zhang, G., Han, C., Ma, K., Guo, X., Wan, F., Kou, L., Yin, S., Liu, L., Huang, J., Xiong, N., Wang, T., 2019. Microglia as modulators of exosomal alpha-synuclein transmission. *Cell Death Dis.* 10, 174. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1404-9>
- Xu, W., Santini, P.A., Sullivan, J.S., He, B., Shan, M., Ball, S.C., Dyer, W.B., Ketas, T.J., Chadburn, A., Cohen-Gould, L., Knowles, D.M., Chiu, A., Sanders, R.W., Chen, K., Cerutti, A., 2009. HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat. Immunol.* 10, 1008–1017. <https://doi.org/10.1038/ni.1753>
- Yakupova, E.I., Bobyleva, L.G., Vikhlyantsev, I.M., Bobylev, A.G., 2019. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Biosci. Rep.* 39. <https://doi.org/10.1042/BSR20181415>
- Yamada, A., Vignes, M., Bureau, C., Mamane, A., Venzac, B., Descroix, S., Viovy, J.-L., Villard, C., Peyrin, J.-M., Malaquin, L., 2016. In-mold patterning and actionable axo-somatic compartmentalization for on-chip neuron culture. *Lab. Chip* 16, 2059–2068. <https://doi.org/10.1039/c6lc00414h>
- Yamada, K., Iwatsubo, T., 2018. Extracellular α -synuclein levels are regulated by neuronal activity. *Mol. Neurodegener.* 13, 9. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0241-0>

- Yamada, M., Iwatsubo, T., Mizuno, Y., Mochizuki, H., 2004. Overexpression of alpha-synuclein in rat substantia nigra results in loss of dopaminergic neurons, phosphorylation of alpha-synuclein and activation of caspase-9: resemblance to pathogenetic changes in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 91, 451–461. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02728.x>
- Yamashita, Y.M., Inaba, M., Buszczak, M., 2018. Specialized Intercellular Communications via Cytosomes and Nanotubes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34, 59–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062932>
- Yamin, G., Uversky, V.N., Fink, A.L., 2003. Nitration inhibits fibrillation of human alpha-synuclein in vitro by formation of soluble oligomers. *FEBS Lett.* 542, 147–152. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00367-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00367-3)
- Yavich, L., Jäkälä, P., Tanila, H., 2006. Abnormal compartmentalization of norepinephrine in mouse dentate gyrus in alpha-synuclein knockout and A30P transgenic mice. *J. Neurochem.* 99, 724–732. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04098.x>
- Yavich, L., Tanila, H., Vepsäläinen, S., Jäkälä, P., 2004. Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 11165–11170. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2559-04.2004>
- Yokota, O., Tsuchiya, K., Uchihara, T., Ujike, H., Terada, S., Takahashi, M., Kimura, Y., Ishizu, H., Akiyama, H., Kuroda, S., 2007. Lewy body variant of Alzheimer's disease or cerebral type lewy body disease? Two autopsy cases of presenile onset with minimal involvement of the brainstem. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 27, 21–35.
- Yu, S., Li, X., Liu, G., Han, J., Zhang, C., Li, Y., Xu, S., Liu, C., Gao, Y., Yang, H., Ueda, K., Chan, P., 2007. Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience* 145, 539–555. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.028>
- Zabel, M.D., Reid, C., 2015. A brief history of prions. *Pathog. Dis.* 73. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv087>
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Muñoz, D.G., de Yébenes, J.G., 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55, 164–173. <https://doi.org/10.1002/ana.10795>
- Zhang, Wei, Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhang, Wanqin, Zhou, Y., Hong, J.-S., Zhang, J., 2005. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 533–542. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2751com>
- Zharikov, A.D., Cannon, J.R., Tapias, V., Bai, Q., Horowitz, M.P., Shah, V., El Ayadi, A., Hastings, T.G., Greenamyre, J.T., Burton, E.A., 2015. shRNA targeting α -synuclein prevents neurodegeneration in a Parkinson's disease model. *J. Clin. Invest.* 125, 2721–2735. <https://doi.org/10.1172/JCI64502>
- Zhong, S., Luo, X., Chen, Xing-shu, Cai, Q., Liu, J., Chen, Xing-hua, Yao, Z., 2010. Expression and subcellular location of alpha-synuclein during mouse-embryonic development. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 469–482. <https://doi.org/10.1007/s10571-009-9473-4>
- Zhou, R.M., Huang, Y.X., Li, X.L., Chen, C., Shi, Q., Wang, G.R., Tian, C., Wang, Z.Y., Jing, Y.Y., Gao, C., Dong, X.P., 2010. Molecular interaction of α -synuclein with tubulin influences on the polymerization of microtubule in vitro and structure of microtubule in cells. *Mol. Biol. Rep.* 37, 3183–3192. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9899-2>
- Zhou, T., Perry, S.F., Berdichevsky, Y., Petryna, S., Fluck, V., Tatic-Lucic, S., 2015. Multi-electrode array capable of supporting precisely patterned hippocampal neuronal networks. *Biomed. Microdevices* 17, 2. <https://doi.org/10.1007/s10544-014-9907-8>

Annexes

Article annexe 1 – Propagation intercellulaire de la toxine BMAA

Neurotoxicity Research 2018 - 5ème auteur



Neurotoxicity of the Cyanotoxin BMAA Through Axonal Degeneration and Intercellular Spreading

Vanessa X. Tan^{1,2} & Benjamin Lassus² & Chai K. Lim¹ & Philippe Tixador² & Josquin Courte² & Alban Bessedé³ & Gilles J. Guillemain¹ & Jean-Michel Peyrin²

Received: 30 April 2017 / Revised: 20 July 2017 / Accepted: 21 July 2017
Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract β -Methylamino-L-alanine (BMAA) is implicated in neurodegeneration and neurotoxicity, particularly in ALS-Parkinson Dementia Complex. Neurotoxic properties of BMAA have been partly elucidated, while its transcellular spreading capacity has not been examined. Using reconstructed neuronal networks in microfluidic chips, separating neuronal cells into two subcompartments: (1) the proximal, containing first-order neuronal soma and dendrites, and (2) a distal compartment, containing either only axons originating from first-order neurons or second-order striatal neurons—creates a cortico-striatal network. Using this system, we investigated the toxicity and spreading of BMAA in murine primary neurons. We used a newly developed antibody to detect BMAA in cells. After treatment with 1 μ M BMAA, the cyanotoxin was incorporated in first-degree neurons. We also observed a rapid trans-neuronal spread of BMAA to unexposed second-degree neurons in 48 h, followed by axonal degeneration, with limited somatic death. This *in vitro* study demonstrates BMAA axonal toxicity at sublethal concentrations

and, for the first time, the transcellular spreading abilities of BMAA. This neuronal dying forward spread that could possibly be associated with progression of some neurodegenerative diseases especially amyotrophic lateral sclerosis.

Keywords BMAA · Axonal degeneration · Spread · Neurotoxic · Microfluidics

Introduction

β -Methylamino-L-alanine (BMAA) is a secondary metabolite produced by cyanobacteria and has been associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinson's Dementia Complex (ALS/PDC) and possibly other neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases (Cox et al. 2016; Lemere et al. 2004). Increasing evidence points towards BMAA, as a potential contributing factor for sporadic Motor Neuron Disease (MND) or specifically ALS. An association with ALS was first observed in local Chamorro people of Guam, subsequently correlated to increased incidences of ALS/PDC in the Kii peninsular of Japan, and the Irian Jaya of New Guinea (Spencer et al. 1987a, b, c). Fundamentally, these correlations were linked to the use of cycads for nutrition and medicine, and the consumption of flying foxes, which feed on cycad seeds, bioaccumulating BMAA (Murch et al. 2004). Studies have shown that BMAA can be adsorbed into the circulatory system in rats (Duncan et al. 1991), and non-human primates (Cox et al. 2016; Duncan et al. 1992), and transplacental transmission of BMAA has been documented (Karlsson et al. 2009b). BMAA has also been found in the brains of ALS/PDC patients (Murch et al. 2004) and has been detected in human cerebrospinal fluid (CSF) samples from both ALS and controls (Berntzon et al. 2015). Scientists and

Gilles J. Guillemain and Jean-Michel Peyrin are co-last authors.

* Gilles J. Guillemain
gilles.guillemain@mq.edu.au

* Jean-Michel Peyrin
jean-michel.peyrin@upmc.fr

¹ Present address: Macquarie University Centre for MND Research, Department of Biological Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Macquarie University, Sydney, NSW, Australia

² Present address: Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Neuroscience Paris Seine, Adaptation Biologique et vieillissement, F-75005 Paris, France

³ ImmuSmol, Pessac, France

neurologists in the USA, France and Canada have observed a high incidence of sporadic ALS cases in specific areas called "hot spots" (Becker et al. 2009; Masseret et al. 2013; Torbick et al. 2014). In Australia, the Riverina is to have seasonal cyanobacterial blooms in both recreational and drinking water, and its habitants appears to have an increased incidence compared to the national average. (Personal communication from Prof Dominic Rowe, Director of the MND clinic at Macquarie University).

In recent years, studies have presented consistent data showing BMAA in patient tissue, and the neurotoxic effects of BMAA in animal models, as well as in *in vitro* culture studies (Bemtson et al. 2015; Buenz and Howe 2007; Chiu et al. 2012, 2013; Karlsson et al. 2011; Lewis et al. 1990; Lobner et al. 2007; Murch et al. 2004; Okle et al. 2013; Rao et al. 2006; Weiss and Choi 1988). BMAA is associated with various neurotoxic mechanisms such as glutamate excitotoxicity (Brownson et al. 2002; Chiu et al. 2012; Lobner et al. 2007), endoplasmic reticulum (ER) stress (Okle et al. 2013), mitochondrial dysfunction (Chiu et al. 2012), oxidative damage (Okle et al. 2013; Rao et al. 2006), and toxic protein aggregation (Dunlop et al. 2013), resulting in motor deficits, neuronal degeneration and somatic death (Duncan et al. 1992; Karlsson et al. 2015; Lewis et al. 1990; Weiss et al. 1989). Furthermore, the selective toxicity of BMAA towards motor neurons and pyramidal cells both *in vitro* and *in vivo* highlights the potential causal role of BMAA in ALS (Buenz and Howe 2007; Karlsson et al. 2015; Rao et al. 2006). However, toxicological studies have been inconsistent with variability depending on model used, with studies focusing on mechanisms and cellular death (Buenz and Howe 2007; Karlsson et al. 2011; Okle et al. 2013; Weiss and Choi 1988). While apoptosis is an important mechanism for neuronal death in the late-onset of several brain diseases including the ALS (Moisse et al. 2009; Valdez et al. 2012), it is becoming increasingly clear that cellular death is an end point and better understanding of neuronal suffering is required to interfere with the degeneration process.

Axonal and synaptic degenerations are critical events in neuronal degeneration processes (Coleman 2005; Fischer et al. 2004; Jaarsma et al. 2000; Raff et al. 2002), and the molecular pathways involved remain elusive (Godena et al. 2011). In particular, the long axonal projections of motor neurons render them more susceptible than other neuronal cells to local and repetitive injuries (Dadon-Nachum et al. 2011). In progressive neurodegenerative diseases such as ALS (Dupuis and Loeffler 2009), axonal degeneration often proceeds through a protracted dying-back pattern in which dysfunction of nerve terminals precedes neuronal cell body destruction (Dadon-Nachum et al. 2011; Dal Canto and Gurney 1995; Narai et al. 2009), and axonal degeneration is a known clinical and pathological feature of ALS (Fischer and Glass 2007). Indeed, various studies have shown that ALS progresses

spatially and involves sequences of axonal shrinkage (Karlsborg et al. 2004), muscle denervation (Fischer and Glass 2007), and the loss of motor units, which in SOD1 mice are present months before clinical symptoms appear (Aggarwal and Nicholson 2002), and with a gradient of axonal pathology increasing from proximal to the distal nerves (Daroff et al. 2012). Other studies, however, support a dying forward hypothesis during which pre-synaptic dysfunction leads to trans-synaptic damage to connected neurons (Calvo et al. 2014). Interestingly, recent neuropathological evidence indicates that ALS neuropathological hallmarks spread along neural pathways in the brain. In line with these observations, recent studies shows that proteins such as SOD1 and TDP-43 can behave as prion-like elements spreading from neuron to neuron (King et al. 2013; Pokrishevsky et al. 2016; Polymenidou and Cleveland 2011), thus raising the possibility that toxic proteins disseminating along neuronal networks may hamper their robustness. Regardless of the mechanism of dying backward or forward, the preservation of neuronal cell bodies has been shown not to improve the symptoms or the lifespan of patients (Fischer and Glass 2007) nor aid axonal health (Sagot et al. 1997). Furthermore, both dying forward and dying back processes triggers neuronal network disconnection and progressive network collapse. The present study thus investigates the neurotoxicity of L-BMAA using a novel microfluidic device (Peyrin et al. 2011), that allows distinct observations of toxicity in neuronal subcompartments of somas, as well as axons and synapses.

Here, using rodent derived neuronal networks reconstructed in microfluidic environments (Deleglise et al. 2014; Peyrin et al. 2011), we investigate whether low doses of BMAA triggers progressive neuronal networks collapse. We therefore characterize two effects of BMAA toxicity on primary culture of fully differentiated cortico-striatal networks: Firstly, the transneuronal spread of BMAA from neuron to neuron; secondly, if BMAA has a role in causing Wallerian degeneration of neurons through assessing axonal degeneration of neuronal soma treated with BMAA.

Materials and Methods

Primary Culture in Microfluidic Chips

Animal ethics was approved by the C2EA-05 Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin. Microfluidic chips were fabricated as in the study of Peyrin et al. (2011). Briefly, two cell culture chambers (proximal and distal) each connected to two reservoirs are separated by narrowing 15-3 μm tapered microchannels (Fig.). A middle channel connected to a separate pair of reservoirs perpendicularly transverses the separating microchannels, maintaining fluidic pressure on both chambers. E14 Swiss mice (Janvier,

(i) Graphical microfluidic chip

(ii) Light microscope image of microchannels

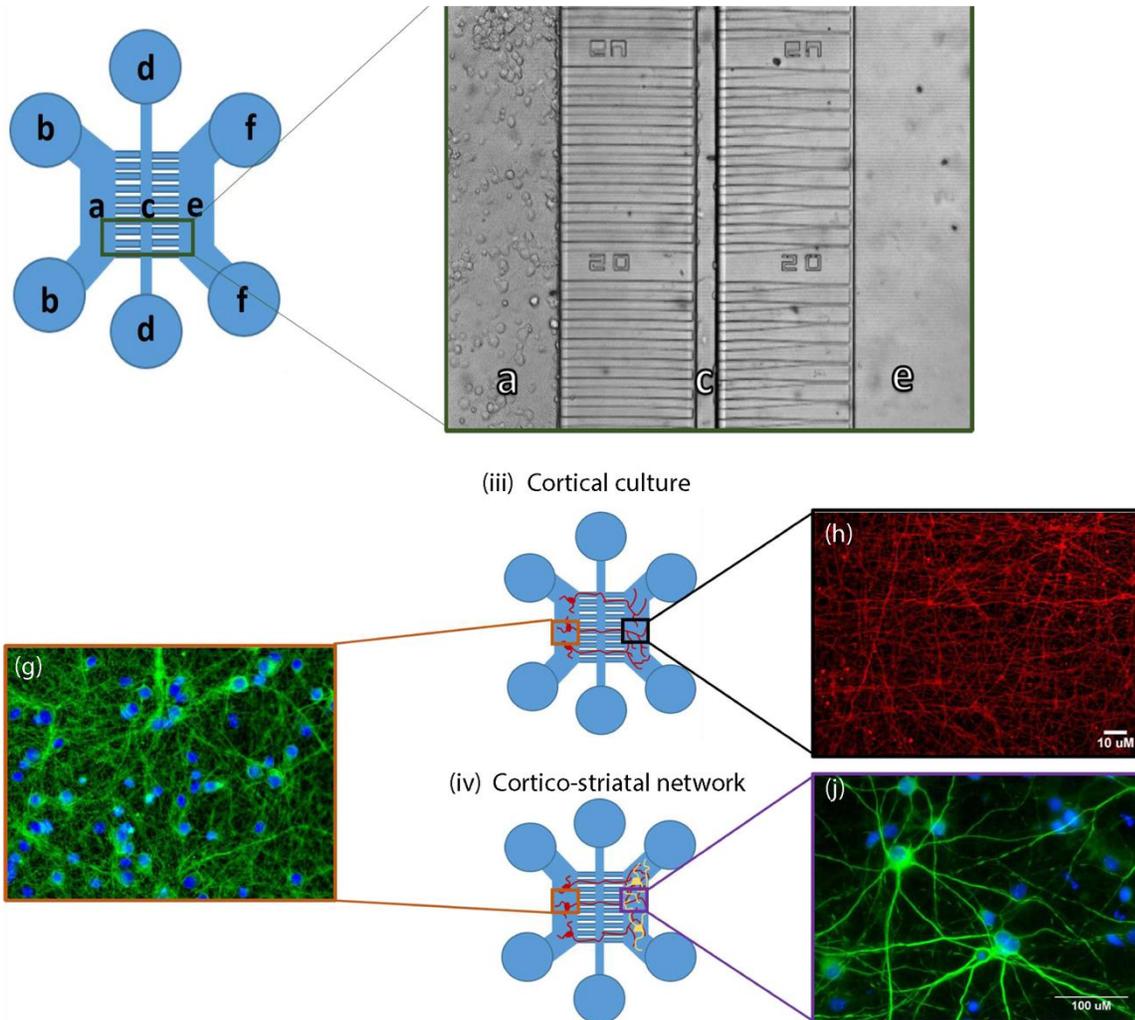


Fig. 1 Microfluidic chips. (i) Graphical representation of microfluidic chip; (ii) photo of microfluidic chip showing middle microchannels: proximal chamber, proximal reservoirs, c middle microchannels of 15 μm tapered microchannels connecting the proximal to distal chambers, d middle reservoirs, e distal chamber, f distal reservoirs; (iii) cortical cultures, (iv) cortico-striatal networks; corresponding culture images of g cortical somatic bodies in proximal compartment stained for axons (green) and nuclei (blue), as well as distal compartments, featuring cortical axons stained for axons (red), or j striatal neurons in the distal chamber to build a cortico-striatal network (MAP2 green, nuclei, blue) (colour figure online)

Le Genest-Saint-Isle, France) were sacrificed and dissected in PBS-glucose (PBS without calcium or magnesium, supplemented with 0.1% glucose). Cortices and ganglionic eminences were microdissected and washed gently twice in fresh PBS-glucose before digestion with papain or trypsin, respectively, in DMEM with DNase, and mechanically dissociated. Cortical cells were seeded at 5.1×10^5 cells in the proximal chambers and striatal cells at 1.36×10^6 on the distal chambers to create cortico-striatal networks. Cells were cultured in

DMEM supplemented with 5% FCS, 1% N2, 2% B27 and 1% Pen/Strep. Culture media was renewed every 3 days.

BMAA Treatment

Ten- to 15-day post seeding, microfluidic chips were screened by phase contrast microscopy before treatment. Cultures were selected for somatic survivals of $> 90\%$ and $< 80\%$ of axons $< 600 \mu\text{m}$ long with $< 20\%$ blebbing. To maintain fluidic

isolation, hydrostatic pressure was created by over-pressurizing the untreated distal chamber. BMAA was diluted to final concentrations in CM, and all media refreshed before treatment.

Immunostaining

Cells were washed twice with PBS and fixed in 4% PFA-sucrose. Cells were permeabilized with 0.2% TritonX-1% BSA in 1× PBS. Primary antibodies were added in 1% BSA in PBS and incubated overnight at 4 °C. Cells were rinsed in PBS then incubated with corresponding secondary antibodies if required. Primary antibodies included β -tubulin (mouse monoclonal 1:500, Sigma), microtubule associated protein-2 (mouse MAP2, 1:500, Sigma; Rabbit MAP2, 1:500, Millipore), and glial-associated fibrillary protein (mouse GFAP, 1:500, Sigma-Aldrich).

Secondary antibodies (1:2000, Thermo Fisher Scientific) coupled to Alexa 350, 488 or 555 were used to visualize primary antibodies, and DAPI, when Alexa 350 was not used. For BMAA staining, cells were fixed and stained according to StainPerfect Immunostaining Kit A (ImmuSmol, Pessac, France). BMAA antibody (ImmuSmol) was used at 1:1000 and detected with the corresponding secondary antibody. Images were acquired with an Axio-observer Z1 (Zeiss, Stuttgart, Germany) fitted with a cooled CCD camera (CoolsnapHQ2, Roper Scientific). The microscope was controlled with MetaMorph software (Molecular Devices, CA, USA), and images were analysed using Fiji software (ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

BMAA Uptake in Cortical Cell Cultures in Microfluidic Platform

To determine if BMAA is taken into cortical cells, 100 μ M BMAA was applied to mature cultures for 48 h, before being fixed and stained for BMAA and Hoechst (cell nuclei). Results were derived from at least six images per chamber, and three independent experiments conducted in triplicates.

Quantifying Axonal Degeneration and Neuronal Survival

To determine the effect of somatic application of BMAA on somatic death and axonal health, cortical cells were seeded in only the proximal chamber, and axons were allowed to grow across into the distal chamber as previously described (Magnifico et al. 2013). Ten to 12 days post seeding, the proximal chambers were treated for 48 h with various concentrations of BMAA (0–1500 μ M) and 1 μ M N-methyl-D-aspartate (NMDA) as a positive, toxic, control and subsequently fixed and stained with β -tubulin (axons) and Hoechst (cell nuclei). As previously described (Kilinc et al. 2011), healthy neurons were characterized by low percentage of condensed nuclei in the proximal chamber, as well as homogenous and

continuous axons in the distal chamber, while blebbed axons exhibit fragmentation. Briefly, axonal fragmentation index was quantified by applying the Otsu Threshold algorithm, calculating the ratio of the area of circular, fragmented axons (Analyse Particle function), against the area of continuous tubular axons (Tubeness function). Results were derived from at least six images per chamber, and at least three independent experiments were conducted in triplicates. Results were assessed using repeated measures, one-way ANOVA and then post test for linear trend GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Transcellular Transmission of BMAA in Reconstructed Cortico-striatal Networks

To show anterograde transmission of BMAA, proximal chambers of cortico-striatal cultures were exposed to BMAA for 48 h, fixed and stained for BMAA and MAP2 or GFAP. At least six images per distal chamber were taken of second-order recipient striatal cells, each treatment done in a minimum of triplicates, in at least three independent experiments. Images were similarly processed using ImageJ, by fixing the threshold intensity in control images, and applying to all images. Total number of MAP2 or GFAP positive cells was enumerated and compared to the number of BMAA and MAP2, or GFAP positive cells, as a percentage. Microfluidic devices were over-pressured to create a pressure gradient across the three chambers to ensure any possible fluid exchange would be unidirectional, maintaining BMAA in the proximal chamber. Chambers were filled with increasing amounts of media in each corresponding reservoir: 30, 40 and 5 μ L (proximal, middle, distal). Results were analysed using one-way ANOVA using GraphPad Prism software.

Results

BMAA is structurally related to amino acids and has been proposed to trigger progressive neuronal death at high (mM) doses both *in vivo* and *in vitro*. While most of the previously published studies focused on neuronal death, in our study, we focused on the effect of low (μ M) doses of BMAA on network related dysfunctions that are known to occur before neuronal soma destruction.

Primary Culture Models in Microfluidics

Microfluidic chips allow for the physical and fluidic separation of neuronal subcompartments (Fig.). Neuronal somas are contained in the proximal chamber through size exclusion (Fig. 1 (a, g)), and axons allowed to grow through microchannels into the middle chamber (Fig. (c)), through to the distal chamber (Fig1 (e)). Distal chambers are used to

assess axonal integrity (Fig. 1 (iii, h)) or to reconstruct oriented cortico-striatal networks (Fig. 1 (iv, j)). Fluidic isolation is maintained by the blockage of microchannels by neuronal axons and creation of a pressure gradient in each chamber and reservoir (Fig. 1 (b, d, f)). We have previously shown that after 15-day *in vitro*, these networks are fully differentiated and synaptically connected (Deleglise et al. 2013).

BMAA Uptake by Cortical Cells

First, using a newly developed anti BMAA antibody (ImmuSmol, France), we determined the uptake of BMAA by cortical neurons grown in compartmentalized microfluidic chambers. Cortical cells in the proximal chamber were qualitatively assessed for their ability to take up BMAA into the cell body. For this, cortical neurons were exposed to 100 μ M of BMAA. In 48-h post exposure, the somato-dendritic uptake of BMAA was evidenced by BMAA staining of the cortical cell chamber. Results show that BMAA signal is specifically present in a subpopulation of cortical cell bodies treated with BMAA, suggesting selectivity in uptake by neuronal subtypes (Fig.

Sublethal Concentrations of BMAA Are Slightly Neurotoxic to Somas and Strongly Toxic Towards Axons

To elucidate the effects of BMAA on neuronal subcompartments, BMAA was administered only to the proximal (somatic) chamber of mouse cortical neurons compartmentalized in a microfluidic environment. This allows for somato-dendritic exposure of cortical cells, leaving axons in

distal chambers untreated (Fig. 1 (iii)). Using similar approaches, we have previously shown that somatic application of mild pro-apoptotic insults and beta amyloids triggers early specific axonal degeneration (Deleglise et al. 2014; Magnifico et al. 2013). The percentage of nuclear condensation in cortical neurons was assessed as a measure of somatic health, with cells displaying nuclear morphology of condensed chromatin and intense DAPI staining with small nuclear size in cells indicative of the initiation of cell death processes. Cell death as observed by nuclear condensation was significant, taking into consideration concentrations tested from 1 to 1500 μ M (repeated measures, one-way ANOVA $p < 0.001$, $R^2 = 0.8594$). Average percentage of nuclei condensation for untreated cells was 13%, and in BMAA treated cells ranged from 12 to 30%, and NMDA treated cells were 41% condensed. However, it is not significant for treatments less than 500 μ M and has an increasing significant effect at 500, 1000 and 1500 μ M (Fig. 4a–g, o).

As shown in Fig. 3, while intact axons stained with β -tubulin in the control neurons, treatment with 10 or 100 μ M BMAA resulted in low-level fragmentation and blebbing in cortical axons, suggesting a potential deleterious effect of BMAA.

Axonal health was therefore assessed upon ramping doses of BMAA via analysis of axonal fragmentation index (FI) that determines continuous (tubular) axons as healthy, as a ratio to fragmented (particles) injured axons (Fig. 4). Results show that untreated cells had an FI of 0.304 (Fig. 4), and 1 μ M BMAA had an FI of 0.342 (Fig. 4). BMAA treatments at 50, 500, 1000 and 1500 μ M resulted in significant changes in FI to 0.392, 0.473, 0.495 and 0.555, respectively (repeated

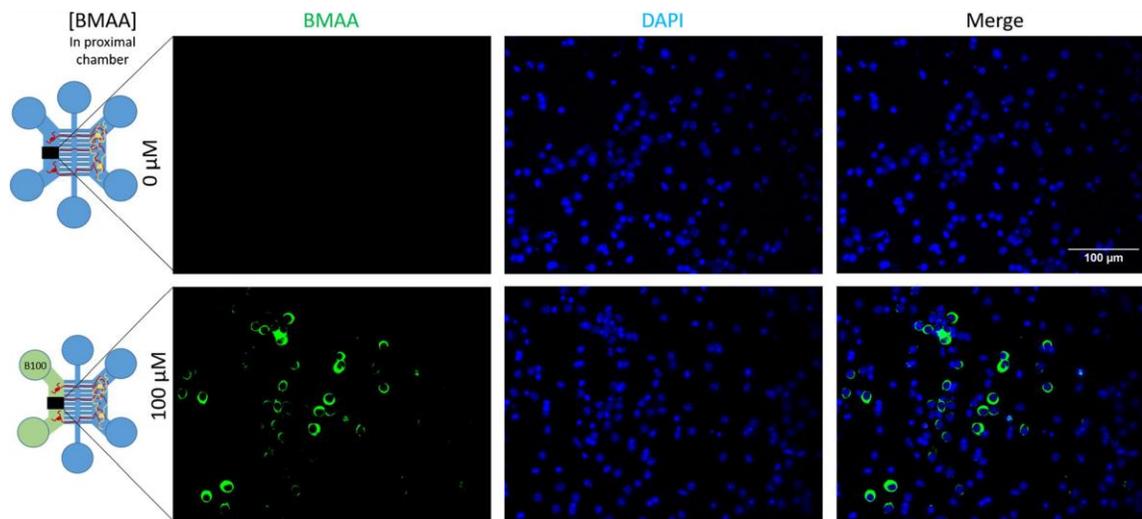


Fig. 2 Uptake of BMAA into treated somas in the proximal chamber. Proximal chamber of cortical cell bodies treated (100 μ M) or not treated (0) with BMAA showing uptake of BMAA into cell bodies. Cells not treated with BMAA do not show any BMAA staining, while cells treated with BMAA show a subpopulation of cells positive for BMAA. Microfluidic schematic represents treatments in fluidic isolation complete media greater BMAA treated. Scale bar 100 μ m (colour figure online)

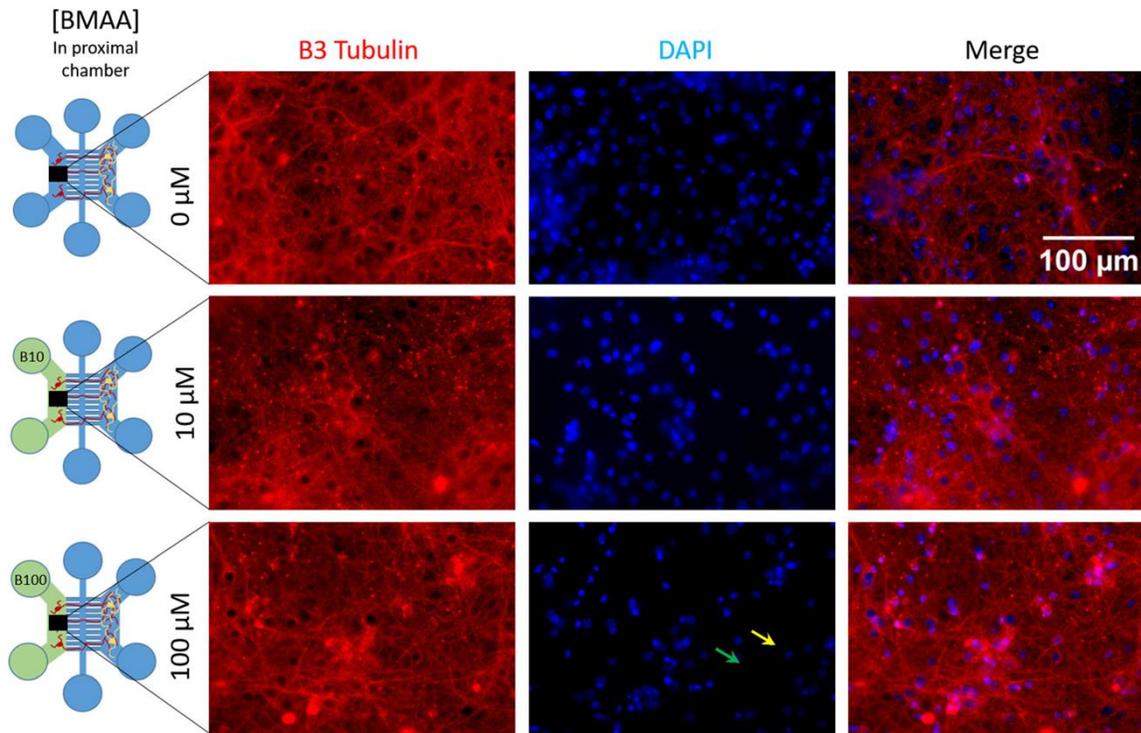


Fig. 3 Somatic health of neurons treated or not treated with BMAA. Images of proximal chambers at treated with 0, 10 or 100 μM BMAA showing structure of axons (β3-tubulin; red) and nuclear staining (DAPI, blue). Untreated cells have little blebbing in axonal structures and modest nuclear condensation, while cells treated with BMAA show increased axonal blebbing and nuclear condensation. Green arrow shows intact nuclei, while yellow arrow shows condensed nuclei. Microfluidic schematic represents treatments in fluidic isolation of complete media reservoirs. Scale bar 100 μm (colour figure online)

measures, one-way ANOVA $p < 0.0001$, $R = 0.9722$) (Fig. 4j–m, p). Positive fragmentation control of NMDA treatment resulted in a FI of 0.972 ($p < 0.0001$) (Fig. 4n). A dose-dependent response can be observed with increases in axonal fragmentation as the concentration of BMAA increases from 50 to 1500 μM and is assessed by the post test for linear trend to be linear ($p < 0.001$).

Transcellular Spread of BMAA to Second-Order Cells

To determine if BMAA can be passed from one neuron to another, we used the cortico-striatal network platform (Fig. 4iv). We expose first-order cortical neurons of a 15-day in vitro cortico-striatal network to 10 and 100 μM BMAA and observe BMAA signals in second-order striatal neurons and astrocytes in the distal chamber.

In the distal chamber, neuronal cells were labelled with MAP2 and DAPI, and neuronal uptake of BMAA was defined by the presence of BMAA and MAP2 in the same cell, expressed as a percentage of total number of MAP2 positive cells (Fig. 5a). Treatment with BMAA at 10 and 100 μM resulted in 14 and 62% of neurons (respectively)

positive for both MAP2 and DAPI. This has a significance of $p > 0.0014$ for a positive presence of BMAA in the striatal cell population of the BMAA treated cortical cells, with multiplicity adjusted p values of > 0.163 and 0.001 for 10 and 100 μM, respectively (Fig. 5b).

Similarly, astrocytic uptake of BMAA was measured by the presence of GFAP and BMAA positive cells, expressed as a percentage of total GFAP positive cells. In GFAP-expressing cells, we observed less BMAA-infected cells with 12 and 23% of the cells positive for BMAA ($p < 0.0589$) and multiplicity-adjusted p values of 0.233 and 0.041 for 10 and 100 μM, respectively (Fig. 6).

To confirm the fluidic isolation capabilities of the chambers, distal and middle chambers were over-pressurized with larger volumes of media in media reservoirs (Fig. 4d, f), creating hydraulic resistance. Additionally, axons obstruct the microchannels, further limiting molecular diffusion between the proximal and distal chambers (Kilinc et al. 2011; Paul et al. 2011). With over-pressurizing, any possible fluid exchange would flow from distal towards the proximal chamber, thereby preventing flow of BMAA containing media in the proximal chamber towards the distal and middle

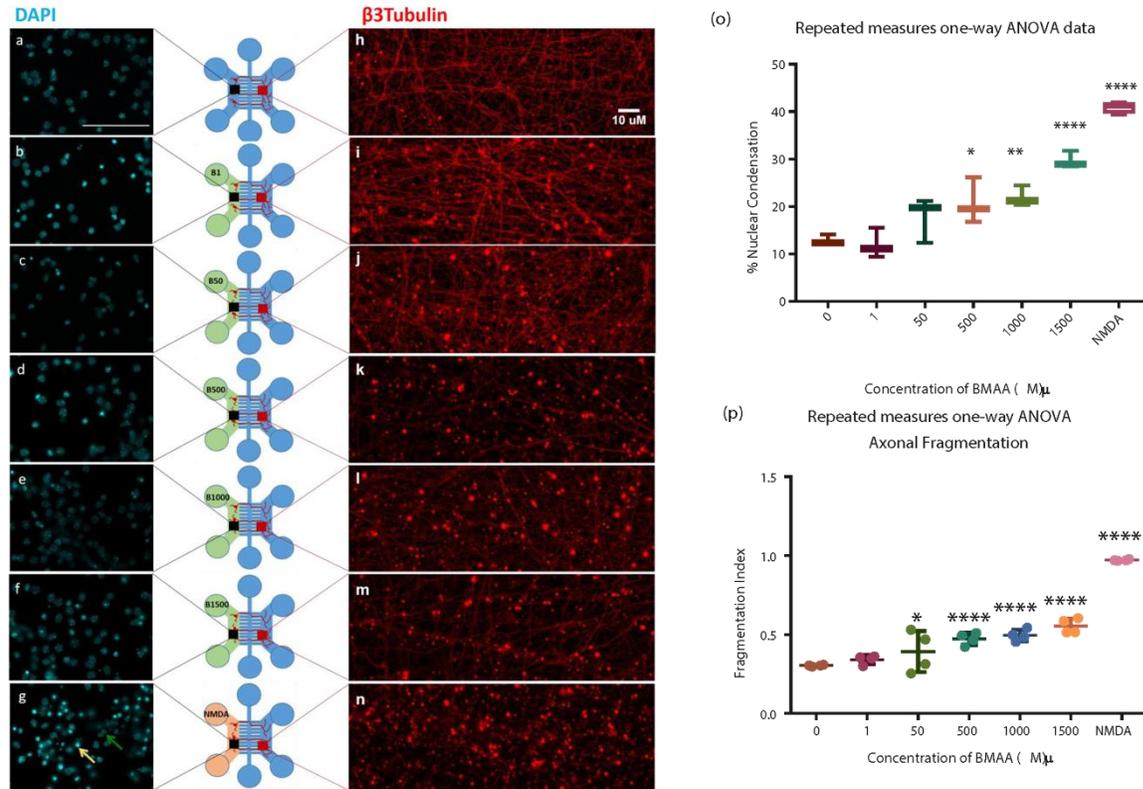


Fig. 4 BMAA neurotoxicity in somatic and axonal subcompartments. BMAA treatment was applied on proximal chambers as represented by microfluidic schematic. Blue: complete media; green: BMAA treated; orange: NMDA. Neurons are untreated (0), or treated with BMAA (1–1500 μM), and 100 μM NMDA as positive control. Representative images of proximal chambers stained with DAPI (cyan): a untreated; b–f 1, 50, 500, 1000 and 1500 μM BMAA; g 100 μM NMDA. Green arrow shows intact nuclei, while yellow arrow shows condensed nuclei. Scale bar 10 μm. Representative high magnification images (×63) of cortical axons in distal chambers stained with β3-tubulin (red) and DAPI (cyan): h untreated; i–m 1, 50, 500, 1000 and 1500 μM BMAA; n 100 μM NMDA. Scale bar 10 μm. o The graph shows nuclear condensation as a result of treatment (at 500 μM BMAA, 100 μM NMDA). Results are

expressed as a percentage of total nuclei count, and significance evaluated by repeated measures, one-way ANOVA test, overall $p < 0.0001$, $R^2 = 0.8594$, multiplicity adjusted (to untreated control): p^* value < 0.05 , p^{**} value < 0.01 , p^{****} value ≤ 0.0001 , post test for linear trend: Linear, $p \leq 0.0001$. Results expressed as mean \pm SD. p The graph represents the relative amount of fragmentation compared to the control, quantified by ratio of tubular and circular structures in axonal compartments. Circles represent individual data points. Analysed by repeated measures, one-way ANOVA, overall $p < 0.0001$, $R^2 = 0.9722$, multiplicity adjusted (to untreated control): p^* value < 0.05 , p^{****} value ≤ 0.0001 , post test for linear trend: Linear, $p \leq 0.0001$. Results expressed as mean \pm SD. 23 (colour figure online)

chambers. Notwithstanding hydraulic resistance, BMAA is consistently observed to be present in the distal chambers, and (3) investigate intercellular transmission of BMAA. Our resulting in the conclusion that BMAA can indeed be passed from cell to cell, and is not an artefact of pressure driven movement. These results indicate that low doses of BMAA can be efficiently spread from neuron to neuron and to astroglial cells and that increasing amounts of BMAA leads to neuronal network collapse.

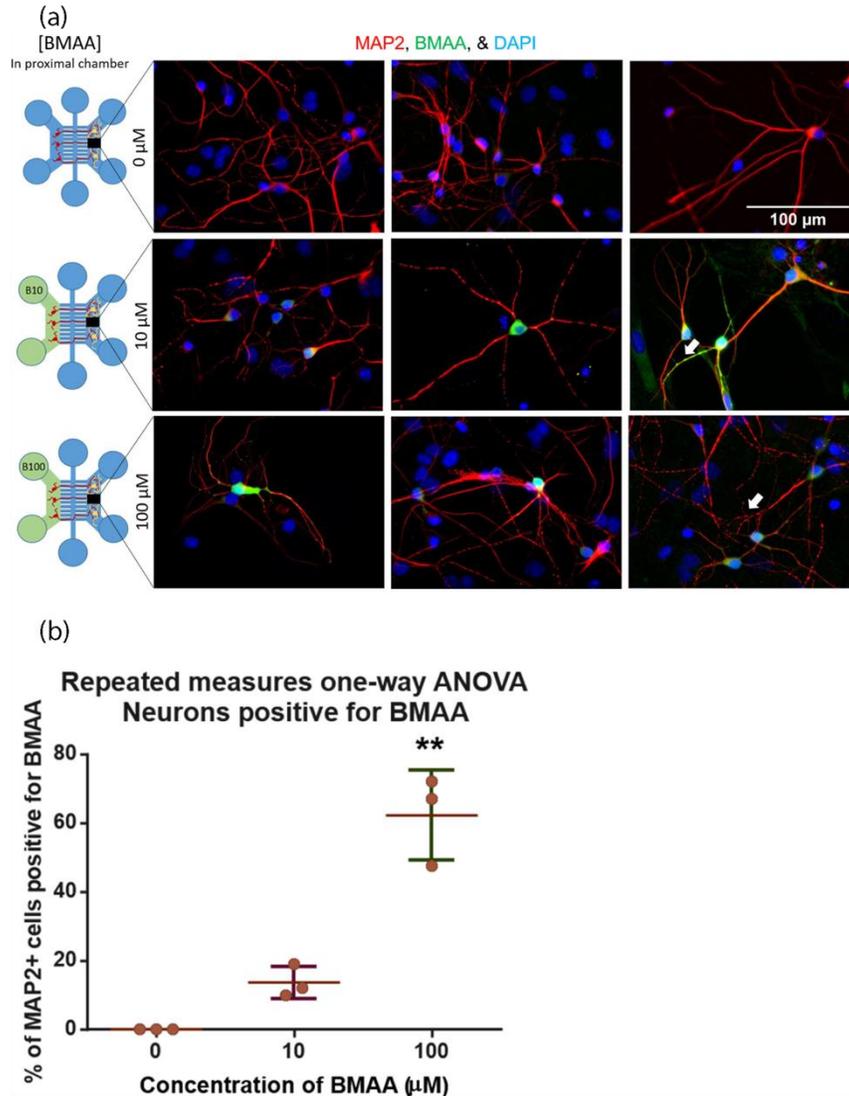
Discussion

This study (1) demonstrates use sublethal doses of BMAA to observe changes in neuronal subcompartments; (2)

investigates the effects of BMAA before cells start to die; and (3) investigate intercellular transmission of BMAA. Our results are in line with notions showing that ALS related disorders spreads along neuronal pathways and support the concept that BMAA may initiate neuronal network collapse. The outcomes of this study provide an intermediate between the conflicting views on the role of BMAA in neurodegeneration and neurodegenerative diseases.

Although BMAA has been suspected to be a causal agent for ALS for the last 40 years (Spencer et al. 1987c), it has not been concretely linked to ALS. There are several rationales for the rejection of BMAA having a role in ALS: First, the ubiquitous distribution of BMAA producing cyanobacteria (Bradley and Maslow 2009; Chiu

Fig. 5 Cellular uptake of BMAA in neurons of distal chambers. Representative images of MAP2+ cells (red) staining for BMAA (green) in untreated, distal striatal chambers showing spread of BMAA from proximal chambers treated with 0, 10 and 100 μ M of BMAA. White arrows indicate presence of blebbing. Microfluidic schematic represents treatments in fluidic isolation; blue complete mediagreen BMAA treated. Scale bar 100 μ M. b Quantification showing spread of BMAA into neurons of untreated distal chambers. Graph shows percentage quantification of second-order neurons positive for MAP2 and BMAA of total MAP2-positive cells. Only proximal first-order neurons were treated with 0, 10 and 100 μ M BMAA. Analysed by repeated measures, one-way ANOVA with cumulative value of 0.0014 and multiplicity adjusted values of 0.1634 and 0.0011 for 10 and 100 μ M, respectively. Results expressed as mean \pm SD (colour figure online)

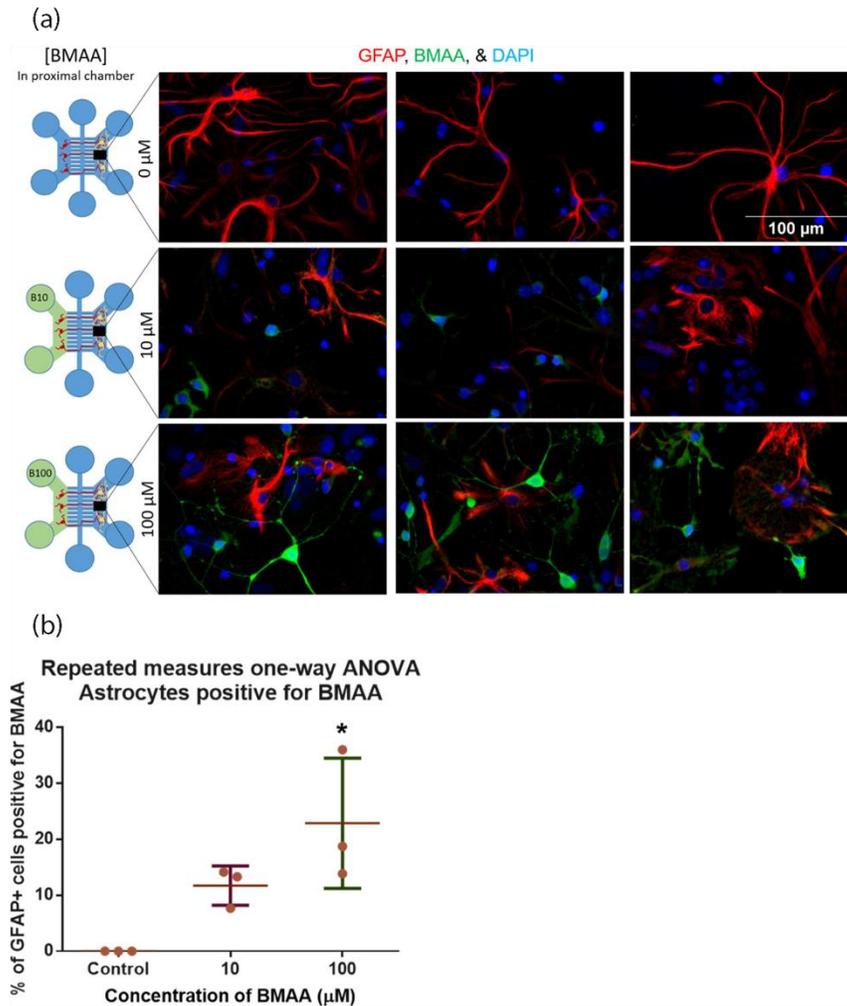


et al. 2011; Meneely et al. 2016); secondly, the washing processes before consumption of cycad seeds results in the removal of a large amounts of BMAA (Chiu et al. 2011); and lastly, the pathological concentrations of BMAA crossing the BBB or in the body required to cause damage in vitro or in in vivo models (Duncan et al. 1990; Karlsson et al. 2009a; Smith et al. 1992; Weiss et al. 1989). The neurotoxicity of BMAA has been demonstrated repeatedly on neuronal cell lines, primary cultures of rodent cells and in vivo studies (Buenz and Howe 2007; Chiu et al. 2012, 2013; Karlsson et al. 2011, 2013; Lobner et al. 2007; Murch et al. 2004; Okle et al. 2013; Rao et al. 2006; Weiss and Choi 1988).

Use of Microfluidics in Investigating BMAA Uptake in Cortical Cells

Microfluidic devices represent a unique tool to study and characterize the cellular mechanisms induced by neurotoxins between cellular subcompartments (Fig.). They can be used to assess therapeutic strategies and allow discovery and application of multipronged drugs that target not only cell death but also axonal degeneration to repair or reduce neurotoxic damages (Szelechowski et al. 2014). We show here the application of a new BMAA antibody (ImmuSmol, France) in detecting intracellular BMAA on the microfluidic platform (Fig.2). We show that murine cortical cells can take up BMAA, resulting

Fig. 6 a Cellular uptake of BMAA in astrocytes of distal chambers. Representative images of GFAP+ cells (red) staining for BMAA (green) in untreated, distal striatal chambers showing spread of BMAA from proximal chambers treated with 0, 10 and 100 μM of BMAA. Microfluidic schematic represents treatments in fluidic isolation; blue complete media; green BMAA treated. Scale bar 100 μm . b Quantification showing spread of BMAA into astrocytes of untreated distal chambers. Graph shows percentage quantification of second-order astrocytes positive for GFAP and BMAA, of total GFAP positive cells. Only proximal first-order neurons were treated with 0, 10 and 100 μM BMAA. Significant presence of BMAA was observed in GFAP-expressing astrocytic cells. Analysed by repeated measures, one-way ANOVA with cumulative value of 0.0589 and multiplicity adjusted values of 0.2332 and 0.0409 for 10 and 100 μm , respectively. Results expressed as mean \pm SD (colour figure online)



in cellular stress through the observation of increased axonal blebbing coupled with nuclear condensation (Fig. 4).

BMAA Causes Wallerian-Like Degeneration

To further investigate the degeneration observed in cortical cells, cortical cultures were used to determine the effects of somatic application of BMAA on axons. We found that low-dose BMAA (50 μM ; Fig. 4) can cause a Wallerian-like degeneration process: damages that do not result in extensive somatic death, but cause axonal fragmentation (Luo and O'Leary 2005; Tsunoda 2008). We also observed a dose-dependent effect on the somatic health of neurons, with significant increase in cell death starting at 50 μM of BMAA (Fig. 4a–g, o). Concordant with our results, Lobner et al. (2007) found that doses less than 1 mM of BMAA cause only slight neuronal death in mixed murine cortical cells and

showed that BMAA at 10 μM can potentiate β -amyloid or 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) mediated neuronal damages. Similarly, Weiss and Choi reported that concentrations of BMAA of less than 300 μM induce limited cortical neuronal loss (Weiss et al. 1989). Furthermore, two studies reported that BMAA at 30 μM cause specifically motor neuron death, and only limited injury to CA1 pyramidal neurons (Buenz and Howe 2007; Cox et al. 2016), as have other studies (Abdulla et al. 1993; Okle et al. 2013), supporting the potential roles of BMAA in ALS neuropathology. Additionally, this study was conducted without additional bicarbonate, where studies show addition of bicarbonate during treatment results in increased cellular toxicity of BMAA (Brownson et al. 2002; Copani et al. 1991).

Axonal degeneration is evident in BMAA treated cells, as demonstrated by observations of increased blebbing and axonal fragmentation, which is significantly increased when

treated with concentrations of BMAA as low as 5 μ M. During the neurodegenerative processes, neuronal cell bodies are clearly affected; however, there is increasing evidence that ALS (Braak and Braak 1991; Gordon 2013). axonal damages are more severe and are crucial for the development and progression of the diseases. By demonstrating the well known preservation of cell body but not restoration of function, several studies have shown that rescuing only cell bodies is not sufficient to alter the course of diseases (Dadon-Nachum et al. 2011; Fischer et al. 2004; Sagot et al. 1997). Additionally, considering the long distances in which motor neuron axons span, these cells are far more vulnerable to axonal insults and degeneration that would result in the characteristic dying back of distal regions of the axons in Wallerian-like degeneration. In ALS patients, this may explain the early asymptomatic changes occur before clinical symptoms (Aggarwal and Nicholson 2002; Eisen et al. 1992; van Zundert et al. 2012), which is also consistent with results obtained with animal models (Fischer et al. 2004; Narai et al. 2009).

Although the treatment of BMAA was short and with sub-lethal doses, we observed clear and significant changes in somatic health and axonal integrity. This is conceivably more in line with the amounts of BMAA that may be ingested via cycads or through the consumption of flying foxes that have biomagnified BMAA, levels but is not within the scope of this study (Banack et al. 2006; Perry et al. 1989; Spencer et al. 1987a). Evidently, further studies are required to clarify the bioavailability and concentrations of BMAA ingested via consumption of contained food with in either the free or bounded forms of BMAA (Murch et al. 2004). Cumulatively, our results showing limited cell death and a clear decline in axonal integrity provide evidence that low-dose BMAA is toxic for primary neurons, contributing to axonal degeneration and withdrawal of support from a diseased cell body, recapitulating a dying-back pattern as observed in Wallerian-like and compartmentalized degeneration reminiscent of network disconnection (Luo and Cleary 2005; Tsunoda 2008).

Transcellular Spreading of BMAA

To understand the effect of BMAA at a network level, we use the cortico-striatal networks to observe if BMAA can be transmitted from cell to cell. We believe this is the first study that investigates BMAA spreading. The presence of BMAA in second-order neurons and astrocytes indicate anterograde axonal transport and transmission of BMAA in a dose-dependent manner, which has been shown in prion-like proteins such as α -synuclein and SOD-1, associated with neurodegenerative diseases (Freundt et al. 2012; Münch and Bertolotti 2011). This is anticipated to occur in cells linked through synapses, nanotubes, or via vesicles such as exosomes or microparticles (Grad and Cashman 2014; Kovacs and Budka 2009; Kuwabara and Yokota 2011). In neurons, this transmission of BMAA is of particular interest

as this could represent a mechanism for the focal neuroanatomical spread of neurodegenerative pathologies such as in ALS. The role of astroglial cells in neurodegenerative disease is well known (Liu et al. 2011; Maragakis and Rothstein 2006; Nagai et al. 2007; Rossi and Volterra 2009), and the presence of BMAA in astrocytes may be attributed to its role in regulation of amino acids and neurotransmitters, thus, explaining the presence of BMAA in astrocytes in the untreated chamber (Fig. 6) (Liu et al. 2011; Maragakis and Rothstein 2006; Yamanaka et al. 2008). Furthermore, a study showed that astrocytes infected with prions have increased neurotoxicity in co-culture with neurons (Cronier et al. 2012).

There are two possible explanations for the partial spreading of BMAA to the receiving second-order neurons in the distal chamber. First, BMAA may only contaminate second-order cells that are functionally connected to a neuron containing BMAA. Trans-neuronal spreading could thus rely on efficient synaptic connections, as proposed for Tau protein, or unknown limiting mechanisms. Importantly, BMAA triggering early axonal degeneration thus may modify BMAA trans-neuronal spreading. Second, specific cell susceptibility, or a specific receptor, regulates the uptake of BMAA into the cell. This is supported by earlier studies showing that BMAA is selectively taken up by specific neuronal cell subtypes such as motor and NADPH-diaphorase neurons, whereas higher degree cortical neurons display only a limited BMAA uptake and loss (Karlsson et al. 2009b; Koh and Choi 1988; Rao et al. 2006; Weiss et al. 1989). In terms of cytotoxicity, it is important to highlight that BMAA was detected mostly in cell somas, which however, exerted a stronger effect on neuronal axons rather than the cell body (Fig. 4 and 5a). BMAA is present in some axons but appear to be absent in others as they may be below detectable limits of the technique.

Proposed Mechanism of BMAA-Mediated Neurodegeneration and Spreading

The excitotoxic mechanism triggered by BMAA is well described (Copani et al. 1991; Rao et al. 2006; Ross et al. 1987; Weiss et al. 1989; Weiss and Choi 1988) and is believed to be initiated through the activation of both NMDA and non-NMDA receptors, leading to calcium increases, cell depolarisation and production of reactive oxygen species (Brownson et al. 2002; Lobner et al. 2007; Rao et al. 2006; Weiss et al. 1989). As mentioned, another cytotoxic effect of BMAA was identified by Dunlop et al. (2013), observing that BMAA may be misincorporated into proteins, an important and new mechanism associated with neurodegenerative diseases. However, alternate mechanisms of BMAA association with proteins have been proposed (Karlsson et al. 2014).

Although this was not formally linked to BMAA misincorporation, another recent study showed that BMAA

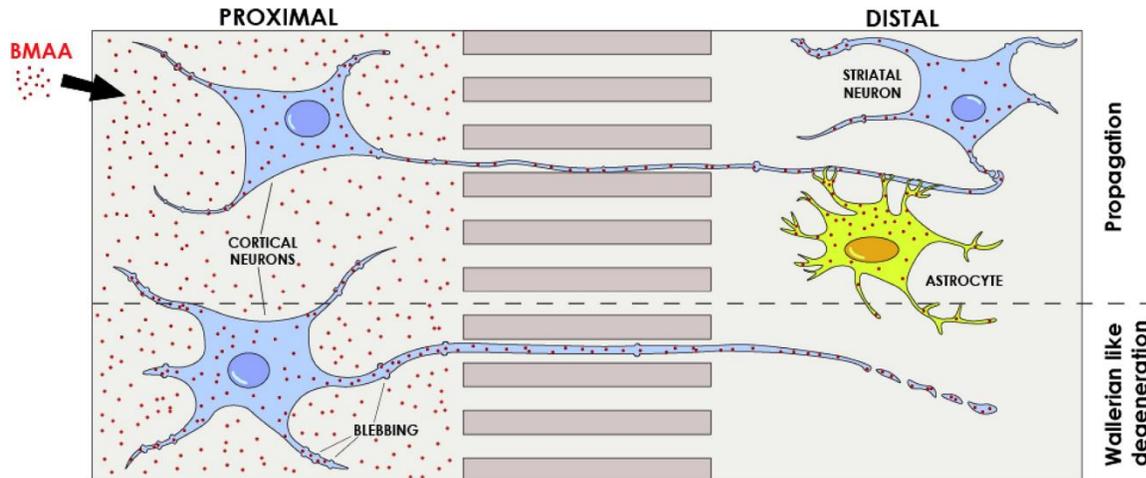


Fig. 7 Summary of BMAA toxicity —two modes of BMAA toxicity: Wallerian-like degeneration and propagation of BMAA from cell to cell

promotes abnormal Tau phosphorylation and aggregation in the capability of BMAA to trigger a prion-like phenomenon in hippocampal neurons (Cox et al 2016). It is thus tempting to speculate that misintegration of BMAA may trigger the misfolding of structural proteins that disrupt the cellular transport, which is crucial for the routing of trophic factors and nutrients to the axons. This will affect neuronal homeostasis leading to the destabilization of the cytoskeleton and cell signalling resulting in progressive functional impairments and ultimately axonal degeneration and somatic loss. This corresponds to a Wallerian-like degeneration model. Additionally, formation of aberrant proteins or structures may also result in nucleation, the initiating process required in prion-like propagation, thereby imposing its aberrant structure on other normal proteins. The observation of intercellular spreading of BMAA to other cells not only results in an amplification of cytotoxicity but also clinically reflects the focal spread of neurodegeneration in ALS. However, more work needs to be done to understand the processes by which BMAA spreads transcellularly.

Is BMAA Involved in the Development of ALS?

The results of this study show that a low amount of BMAA, not previously considered as cytotoxic, can induce alter neuronal integrity. BMAA triggers a Wallerian-like degeneration in neurons, and detection of BMAA in untreated cells indicates a transcellular transmission of BMAA (Fig.7). Together with other factors such as genetics, environmental triggers, lifestyle, physical trauma and ageing (Al-Chalabi et al 2014; Mitchell and Borasio 2007), our results indicate that BMAA contributes to a complex interplay of accumulating factors in the multiple hit hypothesis in ALS (Al-Chalabi et al 2014). A delay or inhibition of axonal degeneration may alleviate clinical symptoms of neurodegeneration, and further research into

and its roles in the disturbance of axonal transportation and degeneration may pave the road for better understanding of ALS mechanisms.

Acknowledgements VXT was funded by Macquarie University Research Excellence Scholarship and Post Graduate Research Funds, as well as a Campus France Eiffel Excellence Scholarship. GJG is funded by the Australian Research Council, Deb Bailey Foundation, MND and Me Foundation and Macquarie University. JMP is funded by ERANET Neuron 2012. The authors thank Dr. Pauline Vaur and Mr. Maxime Pennisson for their expert assistance in microdissection and Mr. Lucas Guillemin for producing Fig.7.

Authors' Contributions VXT, JMP and GJG formulated research ideas. VXT conducted the experiments. VXT, BL, PT and JC contributed to data analyses. Statistical analysis was undertaken by CKL and VXT. VXT, JMP, GJG, CKL and AB contributed to writing of paper.

Compliance with Ethical Standards Animal ethics was approved by the C2EA-05 Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin.

Competing Interests AB is the founder and CEO of ImmuSmol and provided the BMAA antibody and StainPerfect Kit.

References

- Abdulla EM, Campbell IC, Hill D, Park DC (1993) Use of neurite outgrowth as an in vitro method of assessing neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 679:276–279. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb18308.x
- Aggarwal A, Nicholson G (2002) Detection of preclinical motor neurone loss in SOD1 mutation carriers using motor unit number estimation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73:199201. doi:10.1136/JNNP.73.2.199
- Al-Chalabi A, Calvo A, Chio A, Colville S, Ellis CM, Hardiman O, Heverin M, Howard RS, Huisman MHB, Keren N, Leigh PN, Mazzini L, Mora G, Orrell RW, Rooney J, Scott KM, Scotton WJ,

- Seelen M, Shaw CE, Sidle KS, Swingler R, Tsuda M, Veldink JH, Visser AE, van den Berg LH, Pearce N (2014) Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study. *Lancet Neurol* 13:1108–1113. doi:10.1016/S1474-4422(14)70219-4
- Banack SA, Murch SJ, Cox PA (2006) Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *J Ethnopharmacol* 106:97–104. doi:10.1016/j.jep.2005.12.032
- Becker RH, Sultan MI, Boyer GL, Twiss MR, Konopko E (2009) Mapping cyanobacterial blooms in the Great Lakes using MODIS. *J Great Lakes Res* 35:447–453. doi:10.1016/j.jglr.2009.05.007
- Berntzon L, Ronnevi LO, Bergman B, Eriksson J (2015) Detection of BMAA in the human central nervous system. *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.02.032
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:232–259
- Bradley WG, Mash DC (2009) Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotroph Lateral Scler*:7–20. doi:10.3109/17482960903286009
- Brownson DM, Mabry TJ, Leslie SW (2002) The cycad neurotoxic amino acid, β -N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *J Ethnopharmacol* 82:159–167. doi:10.1016/S0378-8741(02)00170-8
- Buenz EJ, Howe CL (2007) Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo. *Neurotoxicology* 28:702–704. doi:10.1016/j.neuro.2007.02.010
- Calvo AC, Manzano R, Mendonça DMF, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R (2014) Amyotrophic lateral sclerosis: a focus on disease progression. *Biomed Res Int* 2014:925101. doi:10.1155/2014/925101
- Chiu AS, Gehring MM, Welch JH, Neilan B a (2011) Does α -amino- β -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int J Environ Res Public Health* 8:3728–3746. doi:10.3390/ijerph8093728
- Chiu AS, Gehring MM, Braidy N, Guillemin GJ, Welch JH, Neilan B a (2012) Excitotoxic potential of the cyanotoxin β -methylamino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicol* 60:1159–1165. doi:10.1016/j.toxicol.2012.07.169
- Chiu IM, Morimoto ETA, Goodarzi H, Liao JT, O'Keefe S, Phatnani HP, Muratet M, Carroll MC, Levy S, Tavazoie S, Myers RM, Maniatis T (2013) A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep* 4:385–401. doi:10.1016/j.celrep.2013.06.018
- Coleman M (2005) Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 6:889–898. doi:10.1038/nrn1788
- Copani A, Canonico PL, Catania MV, Aronica E, Bruno V, Ratti E, van Amsterdam FTM, Gaviraghi G, Nicoletti F (1991) Interaction between β -N-methylamino-L-alanine and excitatory amino acid receptors in brain slices and neuronal cultures. *Brain Res*. doi:10.1016/0006-8993(91)90716-9
- Cox PA, Davis DA, Mash DC, Metcalf J, Banack SA (2016) Dietary exposure to the environmental toxin β -N-methylamino-L-alanine triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc Biol Sci* 283:979–980. doi:10.1098/rspb.2015.2397
- Cronier S, Carimalo J, Schaeffer B, Jaumain E, Beringue V, Miquel M-C, Laude H, Peyrin J-M (2012) Endogenous prion protein conversion is required for prion-induced neuritic alterations and neuronal death. *FASEB J* 26:3854–3861. doi:10.1096/fj.11-201772
- Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D (2011) The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci* 43:470–477. doi:10.1007/s12031-010-9467-1
- Dal Canto MC, Gurney ME (1995) Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* 676:25–40. doi:10.1016/0006-8993(95)00063-V
- Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J, Mazzotta JC (2012) Neuro-ophthalmology: ocular motor system | *Bradley's neurology in...*
- Deleglise B, Lassus B, Soubeyre V, Alleaume-Butaux A, Hjorth JJ, Vignes M, Schneider B, Brugg B, Viovy JL, Peyrin JM (2013) Synapto-Protective Drugs Evaluation in Reconstructed Neuronal Network. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0071103
- Deleglise B, Magnifico S, Duplus E, Vaur P, Soubeyre V, Belle M, Vignes M, Viovy J-L, Jacotot E, Peyrin J-M, Brugg B (2014) β -Amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. *Acta Neuropathol Commun* 2:145. doi:10.1186/s40478-014-0145-3
- Duncan MW, Steele JC, Kopin IJ, Markey SP (1990) β -Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology* 40:767–772. doi:10.1212/WNL.40.5.767
- Duncan MW, Villacreses NE, Pearson OG, Wyatt L, Rapoport SI, Kopin IJ, Markey SP, Smith QR (1991) 2-Amino-3-(Methylamino)-propanoic acid (BMAA) pharmacokinetics and blood-brain barrier permeability in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 258:2785
- Duncan MW, Markey SP, Weick BG, Pearson PG, Ziffer H, Hu Y, Kopin IJ (1992) 2-Amino-3-(methylamino) propanoic acid (BMAA) bio-availability in the primate. *Neurobiol Aging* 13:333–337. doi:10.1016/0197-4580(92)90047-2
- Dunlop RA, Cox PA, Banack SA, Rodgers KJ (2013) The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of serine causing protein misfolding and aggregation. *PLoS One* 8: e75376. doi:10.1371/journal.pone.0075376
- Dupuis L, Loeffler J-P (2009) Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr Opin Pharmacol* 9:341–346. doi:10.1016/j.coph.2009.03.007
- Eisen A, Kim S, Pant B (1992) Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve* 15:219–224. doi:10.1002/mus.880150215
- Fischer LR, Glass JD (2007) Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neurodegener Dis* 4:434–442. doi:10.1159/000107704
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis A a, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak M a, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185:232–240. doi:10.1016/j.expneurol.2003.10.004
- Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, Covert M, Melki R, Kirkegaard K, Brahic M (2012) Neuron-to-neuron transmission of α -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann Neurol* 72:517–524. doi:10.1002/ana.23747
- Godena VK, Romano G, Romano M, Appocher C, Klima R, Buratti E, Baralle FE, Feiguin F (2011) TDP-43 regulates Drosophila neuromuscular junctions growth by modulating Futsch/MAP1B levels and synaptic microtubules organization. *PLoS One* 6:e17808. doi:10.1371/journal.pone.0017808
- Gordon PH (2013) Amyotrophic lateral sclerosis: an update for 2013 clinical features, pathophysiology, management and therapeutic trials. *Aging Dis* 4:295–310. doi:10.14336/AD.2013.0400295
- Grad LI, Cashman NR (2014) Prion-like activity of Cu/Zn superoxide dismutase. *Prion* 8:33–41. doi:10.4161/pri.27602
- Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, London J, Holstege JC (2000) Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SO. *Neurobiol Dis* 7:623–643. doi:10.1006/nbdi.2000.0299
- Karlsborg M, Rosenbaum S, Wiegell M, Simonsen H, Larsson H, Werdelin L, Gredal O (2004) Corticospinal tract degeneration and possible pathogenesis in ALS evaluated by MR diffusion tensor

- imaging. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 5: 136–140. doi:10.1080/14660820410018982
- Karlsson O, Berg C, Brittebo EB, Lindquist NG (2009a) Retention of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in melanin and neuromelanin-containing cells - a possible link between Parkinson-dementia complex and pigmentary retinopathy. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:120–130. doi:10.1111/j.1755-148X.2008.00508.x
- Karlsson O, Lindquist NG, Brittebo EB, Roman E (2009b) Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicol Sci* 109:286–295. doi:10.1093/toxsci/kfp062
- Karlsson O, Roman E, Berg A-L, Brittebo EB (2011) Early hippocampal cell death, and late learning and memory deficits in rats exposed to the environmental toxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) during the neonatal period. *Behav Brain Res* 219:31–40. doi:10.1016/j.bbr.2011.01.056
- Karlsson O, Kultima K, Wadensten H, Nilsson A, Roman E, Andrén PE, Brittebo EB (2013) Neurotoxin-induced neuropeptide perturbations in striatum of neonatal rats. *J Proteome Res* 12:1678–1690. doi:10.1021/pr3010265
- Karlsson O, Jiang L, Andersson M, Ilag LL, Brittebo EB (2014) Protein association of the neurotoxin and non-protein amino acid BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in the liver and brain following neonatal administration in rats. *Toxicol Lett* 226:1–5. doi:10.1016/j.toxlet.2014.01.027
- Karlsson O, Berg A-L, Hanrieder J, Arnerup G, Lindström A-K, Brittebo EB (2015) Intracellular fibril formation, calcification, and enrichment of chaperones, cytoskeletal, and intermediate filament proteins in the adult hippocampus CA1 following neonatal exposure to the nonprotein amino acid BMAA. *Arch Toxicol* 89:423–436. doi:10.1007/s00204-014-1262-2
- Kilinc D, Peyrin J-M, Soubeyre V, Magnifico S, Saias L, Viovy J-L, Brugg B (2011) Wallerian-like degeneration of central neurons after synchronized and geometrically registered mass axotomy in a three-compartmental microfluidic chip. *Neurotox Res* 19:149–161. doi:10.1007/s12640-010-9152-8
- King OD, Gitler AD, Shorter J (2013) The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Res* 61–80. doi:10.1016/j.brainres.2012.01.016
- Koh JY, Choi DW (1988) Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. *J Neurosci* 8:2153–2163
- Kovacs GG, Budka H (2009) Molecular pathology of human prion diseases. *Int J Mol Sci* 10:976–999. doi:10.3390/ijms10030976
- Kuwabara S, Yokota T (2011) Propagation: prion-like mechanisms can explain spreading of motor neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82:1181–1182. doi:10.1136/jnnp-2011-300691
- Lemere CA, Beierschmitt A, Iglesias M, Spooner ET, Bloom JK, Leverone JF, Zheng JB, Seabrook TJ, Louard D, Li D, Selkoe DJ, Palmour RM, Ervin FR (2004) Alzheimer's disease A β vaccine reduces central nervous system β levels in a non-human primate, the Caribbean Vervet. *Am J Pathol* 165:283–297. doi:10.1016/S0002-9440(10)63296-8
- Lewis MD, McQueen IN, Scanlon MF (1990) Motor neurone disease serum and beta-N-methylamino-L-alanine stimulate thyrotrophin-releasing hormone production by cultured brain cells. *Brain Res* 537:251–255
- Liu W, Tang Y, Feng J (2011) Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci* 89:141–146. doi:10.1016/j.lfs.2011.05.011
- Lobner D, Piana PMT, Salous AK, Peoples RW (2007) Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Dis* 25:360–366. doi:10.1016/j.nbd.2006.10.002
- Luo L, O'Leary DDM (2005) Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 28:127–156. doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135632
- Magnifico S, Saias L, Deleglise B, Duplus E, Kilinc D, Miquel M-CC, Viovy J-L, Brugg B, Peyrin J-MM (2013) NAD acts on mitochondrial SirT3 to prevent axonal caspase activation and axonal degeneration. *FASEB J* 27:4712–4722. doi:10.1096/fj.13-229781
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:67–89. doi:10.1038/ncpneuro0355
- Masseret E, Banack S, Boumédiène F, Abadie E, Briant L, Vaquer A, Morales R, Pageot NN, Metcalf J, Cox P, Camu W, Pernet F, Juntas-Morales R, Pageot NN, Metcalf J, Cox P, Camu W (2013) Dietary BMAA exposure in an amyotrophic lateral sclerosis cluster from Southern France. *PLoS One* 8:e83406. doi:10.1371/journal.pone.0083406
- Meneely JP, Chevallier OP, Graham S, Greer B, Green BD, Elliott CT (2016) β -Methylamino-L-alanine (BMAA) is not found in the brains of patients with confirmed Alzheimer's disease. *Sci Rep* 6: 36363. doi:10.1038/srep36363
- Mitchell JD, Borasio GD (2007) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 369:2031–2041. doi:10.1016/S0140-6736(07)60944-1
- Moisse K, Mephram J, Völkner K, Welch I, Hill T, Strong MJ (2009) Cytosolic TDP-43 expression following axotomy is associated with caspase 3 activation in NFL $^{-/-}$ mice: support for a role for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain Res* 1296: 176–186. doi:10.1016/j.brainres.2009.07.023
- Münch C, Bertolotti A (2011) Self-propagation and transmission of misfolded mutant SOD1: prion or prion-like phenomenon? *Cell Cycle* 10:1711. doi:10.4161/cc.10.11.15560
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA (2004) A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12228–12231. doi:10.1073/pnas.0404926101
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10:615–622. doi:10.1038/nn1876
- Narai H, Manabe Y, Nagai M, Nagano I, Ohta Y, Murakami T, Takehisa Y, Kamiya T, Abe K (2009) Early detachment of neuromuscular junction proteins in ALS mice with SODG93A mutation. *Neurol Int* 1:e16. doi:10.4081/ni.2009.e16
- Okle O, Stemmer K, Deschl U, Dietrich DR (2013) L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low nonexcitotoxic concentrations. *Toxicol Sci* 131:217–224. doi:10.1093/toxsci/kfs291
- Parnell S (2015) Algal bloom linked to motor neurone disease. <https://www.inkling.com/read/bradley-neurology-clinical-practice-daroff-6th/chapter-1/diagnosis-of-neurological>
- Perry TL, Bergeron C, Biro AJ, Hansen S (1989) β -N-methylamino-L-alanine: chronic oral administration is not neurotoxic to mice. *J Neurol Sci* 94:173–180. doi:10.1016/0022-510X(89)90227-X
- Peyrin J-M, Deleglise B, Saias L, Vignes M, Gougis P, Magnifico S, Betuing S, Pietri M, Caboche J, Vanhoutte P, Viovy J-L, Brugg B (2011) Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab Chip* 11:3663–3673. doi:10.1039/c1lc20014c
- Pokrishevsky E, Grad LI, Cashman NR (2016) TDP-43 or FUS-induced misfolded human wild-type SOD1 can propagate intercellularly in a prion-like fashion. *Sci Rep* 6:22155. doi:10.1038/srep22155
- Polymeridou M, Cleveland DWW (2011) The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS. *Cell* 147:498–508. doi:10.1016/j.cell.2011.10.011

- Raff MC, Whitmore AV, Finn JT (2002) Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296:868–871. doi:10.1126/science.1068613
- Rao SD, Banack SA, Cox PA, Weiss JH (2006) BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Exp Neurol* 201:244–252. doi:10.1016/j.expneurol.2006.04.017
- Ross SM, Seelig M, Spencer PS (1987) Specific antagonism of excitotoxic action of uncommon amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. *Brain Res* 425:120–127. doi:10.1016/0006-8993(87)90490-2
- Rossi D, Volterra A (2009) Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* 80:224–232. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.07.012
- Sagot Y, Vejsada R, Kato AC (1997) A "dry and wet hybrid" lithography technique for multilevel replication templates: Applications to microfluidic neuron culture and two-phase global mixing. *Trends Pharmacol Sci* 18:330–337. doi:10.1016/S0165-6147(97)01094-8
- Smith QR, Nagura H, Takada Y, Duncan MW (1992) Facilitated transport of the neurotoxin, β -N-methylamino-L-alanine, across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 58:1330–1337. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb11346.x
- Spencer P, Palmer V, Herman A, Asmedi HA (1987a) Cycad use and motor neuron disease in Irian Jaya. *Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(87)91883-6
- Spencer PS, Ohta M, Palmer VS (1987b) Cycad use and motor neuron disease in Kii peninsula of Japan. *Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(87)91159-7
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, Robertson RC (1987c) Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237:517–522. doi:10.1126/science.3603037
- Szelechowski M, Bétourné A, Monnet Y, Ferré CA, Thouard A, Foret C, Peyrin J-M, Hunot S, Gonzalez-Dunia D (2014) A viral peptide that targets mitochondria protects against neuronal degeneration in models of Parkinson's disease. *Nat Commun* 5:5181. doi:10.1038/ncomms6181
- Torbick N, Hession S, Stommel E, Caller T (2014) Mapping amyotrophic lateral sclerosis-like risk factors across northern New England. *Int J Health Geogr* 13:1. doi:10.1186/1476-072X-13-1
- Tsunoda I (2008) Axonal degeneration as a self-destructive defense mechanism against neurotropic virus infection. *Futur Virol* 3:579–593. doi:10.2217/17460794.3.6.579
- Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Fox MA, Sanes JR (2012) Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One* 7:e34640. doi:10.1371/journal.pone.0034640
- van Zundert B, Izaurieta P, Fritz E, Alvarez FJ (2012) Early pathogenesis in the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Cell Biochem* 113:3301–3312. doi:10.1002/jcb.24234
- Weiss JH, Choi DW (1988) Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor. *Science* 241:977–979. doi:10.1126/science.3136549
- Weiss JH, Koh JY, Choi DW (1989) Neurotoxicity of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and beta-N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain Res* 497:64–71
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11:254–253. doi:10.1038/nn2047

Article annexe 2 - Revue sur les mécanismes de propagation
intercellulaire des prions - Cellular and Molecular Biology 2018 -
2ème auteur



Cellular mechanisms responsible for cell-to-cell spreading of prions

Didier Vilette¹ · Josquin Courte^{2,4} · Jean Michel Peyrin² · Laurent Coudert³ · Laurent Schaeffer³ · Olivier Andréoletti¹ · Pascal Leblanc³

Received: 17 January 2018 / Revised: 4 April 2018 / Accepted: 23 April 2018
© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018

Abstract

Prions are infectious agents that cause fatal neurodegenerative diseases. Current evidence indicates that they are essentially composed of an abnormally folded protein (PrP^{Sc}). These abnormal aggregated PrP^{Sc} species multiply in infected cells by recruiting and converting the host PrP^C protein into new PrP^{Sc}. How prions move from cell to cell and progressively spread across the infected tissue is of crucial importance and may provide experimental opportunity to delay the progression of the disease. In infected cells, different mechanisms have been identified, including release of infectious extracellular vesicles and intercellular transfer of PrP^{Sc}-containing organelles through tunneling nanotubes. These findings should allow manipulation of the intracellular trafficking events targeting PrP^{Sc} in these particular subcellular compartments to experimentally address the relative contribution of these mechanisms to in vivo prion pathogenesis. In addition, such information may prompt further experimental strategies to decipher the causal roles of protein misfolding and aggregation in other human neurodegenerative diseases.

Keywords Prion diseases · Protein aggregation · Extracellular vesicles · Exosomes · Multivesicular bodies

Abbreviations

BMDCs	Bone-marrow-derived dendritic cells
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
EVs	Extracellular vesicles
FDC	Follicular dendritic cells
MVBs	Multivesicular bodies
PMCA	Protein misfolding cyclic amplification

TNTs	Tunneling nanotubes
TSEs	Transmissible spongiform encephalopathies
PrP ^C	Normal form of the PrP protein in uninfected tissues or cells
PrP ^{Sc}	Misfolded form of PrP found in infected cells and tissues

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), or prion diseases, are a group of fatal neurodegenerative diseases affecting humans and animals [1–3]. These include scrapie in sheep and goats, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, chronic wasting disease (CWD) in cervids, and Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) in humans. TSEs are characterized by the conformational conversion of the normally soluble, protease-sensitive membrane-associated cellular prion protein (PrP^C) into an abnormally folded, detergent-insoluble, and generally partially protease-resistant isoform called PrP^{Sc} [4]. Aggregates of PrP^{Sc} accumulate specifically in infected tissues, i.e., in the central nervous system (CNS) and in the lymphoid tissues. Neuropathology is strictly confined to restricted regions of the CNS. It includes vacuolar spongiosis (hence the name of the disease), neuronal cell

- ✉ Didier Vilette
d.vilette@envt.fr
- ✉ Jean Michel Peyrin
jean-michel.peyrin@upmc.fr
- ✉ Pascal Leblanc
pascal.leblanc@univ-lyon1.fr

- ¹ UMR1225, INRA, ENVT, Ecole Nationale Vétérinaire, 23 Chemin des Capelles, Toulouse, France
- ² Neurosciences Paris Seine, UMR8246, Inserm U1130, IBPS, UPMC, Sorbonne Universités, 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France
- ³ Insitut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon I, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France
- ⁴ Laboratoire Physico Chimie Curie, UMR168, UPMC, IPGG, Sorbonne Universités, 6 Rue Jean Calvin, 75005 Paris, France

death, and extensive gliosis. A distinctive feature that sets apart TSEs from other neurodegenerative diseases caused by protein aggregation is that prion diseases are infectious. Diseased tissues accumulate considerable levels of infectivity which can be evidenced experimentally through biological titration [5]. Typically, intracerebral inoculation of infected brain tissue diluted 10⁶-fold or even more transmits the disease to 100% of inoculated animals from the same species. Transmission of infection can also be observed in humans in natural conditions as exemplified by the Kuru epidemic in the Fore people of Papua New Guinea [6, 7] and by the transmission of bovine BSE prions [8] to human resulting in variant CJD [9]. In animals, scrapie [10] and CWD [11] are notoriously contagious in sheep and cervids, respectively. Infectivity is tightly linked to the PrP^{Sc} protein [12]. Introduction of PrP^{Sc} into an uninfected host initiates the conformational conversion of the PrP^C into new PrP^{Sc} that will recruit further PrP^C and progressively build up, eventually leading to neuron dysfunction followed by neuronal death. Prion propagation (i.e., the self-templating, seeding-based conversion process, and the progressive accumulation of PrP^{Sc}) can also occur in permissive cultured cell lines and in primary neurons [13]. Since permissive cultured cells inoculated with brain-derived prions accumulate dose-dependent amounts of PrP^{Sc}, robust and rapid cell-based assays have been designed for titration of some prion strains [14, 15]. Finally, prion propagation can also be recapitulated in test tubes through a procedure named protein misfolding cyclic amplification (PMCA) [16]. In this technique, brain or cell extracts containing the PrP^C protein and inoculated with minutes amounts of exogenous PrP^{Sc} are incubated to allow for PrP^C conversion and growth of PrP^{Sc} polymers. The samples are then sonicated to break down the newly formed polymers, thus multiplying the number of seeding units. Serial incubation and sonication steps allow indefinite amplification of PrP^{Sc} and its associated infectivity. Efficient multiplication in a cell-free environment, along with the findings that infectious prions can be obtained from recombinant PrP protein produced in bacteria [7, 18], provides definitive evidence that prion diseases are not due to the conventional infectious agents like viruses [19]. However, one of the most challenging features in the field is the existence of different prion strains. These strains are distinguished by the characteristics of the disease which they trigger in genetically identical animals (e.g., in inbred mice) [20]. They target and damage distinct brain areas, have different incubation periods, and may produce different clinical signs [11]. These characteristics are stable on serial mouse passages provided constant passaging conditions. The strain phenomenon has long been interpreted as evidence for a hidden nucleic acid as the informational molecule specifying the strain [22, 23]. It is now widely accepted that the main differences among strains are enciphered in different conformations of PrP^{Sc}

that are stably and faithfully propagated during infection of animals, cells [24, 25], or in vitro propagation by PMCA [26]. Indeed, the PrP^{Sc} accumulating upon inoculation with different strains can show distinct biochemical features, the best characterized being the molecular weight after protease digestion [27], the glycosylation pattern [28], the extent of resistance to denaturation [29], and the sedimentation profile in velocity gradients [30]. The diversity of PrP^{Sc} entities may thus be the molecular basis of prion strains, although the direct causal relationship between structure and biological properties is still missing evidence.

Prion spreading from the periphery to the brain and within tissues

In natural infections, infectious prions generally enter the host gastrointestinal tract through oral exposure to contaminated food or environment. Most of prion agents are subsequently detected in the periphery long before they reach the central nervous system where they induce the pathology [2, 31]. After oral exposition, infectivity and/or PrP^{Sc} are detected in gut-associated lymphoid tissues such as Peyer's patches (PPs) and lymph nodes [32]. In infected lymphoid tissues, PrP^{Sc} multiplies in follicular dendritic cells (FDCs) located in the germinal centers which are crucially required for subsequent neuroinvasion [33–35]. FDCs are immobile, non-phagocytic cells, so the question is how they are early infected by orally acquired prions and how they transmit them to lymphoid sympathetic innervation for neuroinvasion.

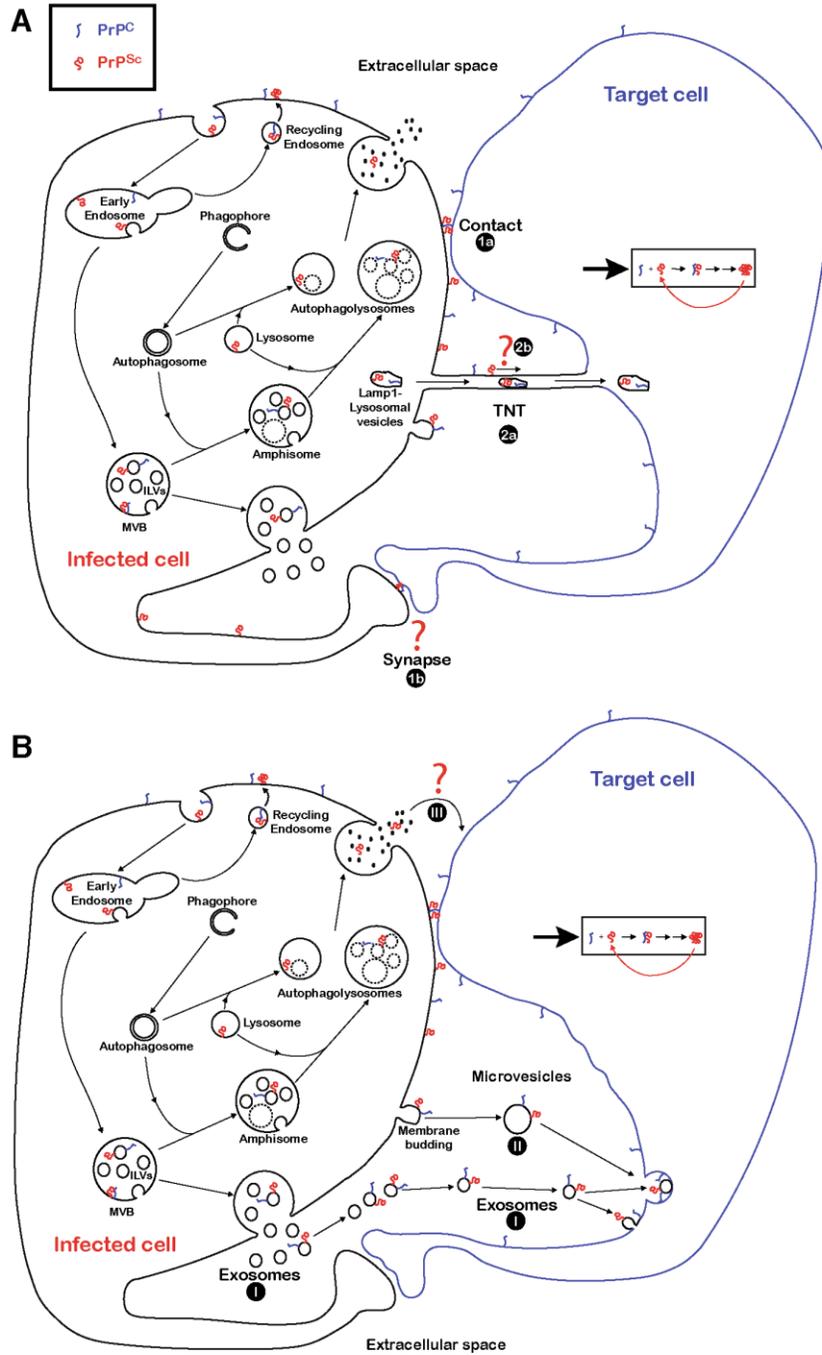
Prions surviving the digestive track passage have to cross the intestinal epithelium. Follicle-associated epithelium (FAE) covers the luminal surface of PPs and contains M cells, a highly phagocytic epithelial cell specialized in transcytosis of pathogens from the lumen [36, 37]. PrP^{Sc} is detected in M cells in vivo [38, 39] and an in vitro study showed that M-like cells actively transcytose prions [40]. The crucial role of M cells to establish infection upon oral challenge was further established in animals [41, 42]. Other studies reported the detection of PrP^{Sc} in enterocytes [43, 44], suggesting that PrP^{Sc} may cross the intestinal epithelium through different pathways. However, the causal role of M-independent transcytosis in the establishment of infection has not been established. Migratory hematopoietic dendritic cells (DCs) sample antigens in tissues and transport them to lymphoid tissues including PPs and mesenteric lymph nodes. Cell-based assays of immuno-purified DCs from infected mice revealed that DCs sequester high levels of infectivity very early postinoculation [45]. Transient depletion of CD11c⁺ at the time of oral exposition blocked accumulation of prions in FDCs of the gut-associated lymphoid tissues and markedly delayed the course of neuroinvasion [46],

demonstrating that DCs play a crucial role to transfer prions from the gut to the lymphoid organs. How prions are then transported from FDC to sympathetic nerves innervating the lymphoid organs? Since no physical contact is observed between FDCs and nerve endings [47], it is not known if prions can be delivered directly by FDCs (e.g., by passive diffusion of cell-free prion particles such as extracellular vesicles [48, 49]) or if additional mobile cells, such as macrophages, must acquire prions from FDCs for transport to the nerves. An initial study suggested that DCs could deliver prions to the peripheral nervous system in *RAG1*^{-/-} mice devoid of FDCs [50]. A later study did not find evidence for such a transfer in FDC-deficient *TNFR1*^{-/-} mice [51]. These contrasting results might be due to higher spleen innervation in *RAG1*^{-/-} compared to wild-type or *TNFR1*^{-/-} mice and to the possibility that contaminating B cells in the DCs populations might have transiently restored FDCs networks in *RAG1*^{-/-} mice. The fact that the relative positioning of FDCs and nerve endings controls the efficiency of peripheral infection [52] is consistent with a transfer mediated by mobile cell carriers and/or cell-free prion particles. Also, macrophages which exhibit long distant migration capacities and brain invasion properties, remains attractive candidates potentially involved in convey *PrP^{Sc}* to distant areas. Expression of *PrP^C* is not required for uptake and transport of *PrP^{Sc}* by mobile cells [39, 43, 53]. In contrast, active prion multiplication both in peripheral sites (e.g., in lymphoid tissues [33] and in peripheral nerves [54]) and in brain [55] is dependent on *PrP^C*. This very brief overview of orally acquired prions' cell pathogenesis illustrates that establishment of natural prion infections in a host is a complex and dynamic process (for a whole picture of the current knowledge on propagation of prions from various peripheral sites to the brain, see [1]). However, the ability of prions to be transferred from one cell to another either in peripheral compartments or between cells within the CNS is a critical feature of the prion life cycle and the first clues on the mechanisms underlying cell-to-cell spreading came from cell culture experiments.

The cell biology of *PrP^{Sc}*

Although the first cell culture model to be permissive to prion multiplication was identified in 1970, most of the *PrP^C*-expressing cell lines tested so far are, for unknown reasons, refractory to prion infection [56]. Intense search led to the identification of a number of cell lines supporting the propagation of prion strains from different animal species including mouse, hamster, sheep, cervids [3], and human [57]. In contrast to primary neurons where prion infection induces apoptosis [58], chronically infected cell lines stably propagate prions over multiple cell passages

without any substantial cytopathic effect. These models have been useful for experimental tools to investigate the cellular biological properties of the *PrP^C* protein as well as the molecular and cellular events controlling the conversion of *PrP^C* into *PrP^{Sc}* in living cells [59]. *PrP^C* is a small glycoprotein, associated with membranes through a glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) anchor, particularly in rafts. The central and carboxy domains of *PrP^C* are essentially structured in alpha helices, while the amino terminus is thought to be unstructured [60]. Within the plasma membrane *PrP^C* is subjected to endocytosis, traffics to early endosomes where it is sorted either to recycling endosomes and sent back to the cell surface or to multivesicular bodies (MVBs), some of which being fused to lysosomes for degradation [61] (Fig. 1). In sharp contrast to *PrP^C*, *PrP^{Sc}* in infected cells and tissues has high beta-sheet content, is aggregated (i.e., it is insoluble in non-ionic detergents) and its central and carboxy domains are resistant to degradation by proteases (e.g., proteinase K, PK) leading to a much more stable form. Importantly, upon biochemical fractionation, prion infectivity has been shown to be tightly associated with lipidic fractions [62–64], while lipidic fraction enhances either bona fide [65] or synthetic [18] prion infectivity. Since *PrP^C* and *PrP^{Sc}* are both detected at the plasma membrane, in the recycling compartments, in the MVBs, and in lysosomes [66, 67], these different compartments have been proposed as sites where *PrP^C* is converted into *PrP^{Sc}*. While a study identified the endosomal recycling compartment as the likely site of prion conversion [68, 69], two later works revealed that inhibition of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) components or other proteins involved in the MVB biogenesis and/or trafficking affects *PrP* conversion, thus suggesting that MVBs could also be a potential intracellular site of *PrP^{Sc}* formation [70, 71]. The use of different cell lines and different prions strains in these three studies may explain these apparent conflicting results, along with different interpretations regarding the role of ALIX in MVBs maturation pathway [70]. However, a pertinent issue regarding the mechanisms of cell-to-cell spreading is how and where the infection process is initiated. Given that *PrP^C* and *PrP^{Sc}* are both present at the cell surface, could *PrP^{Sc}* on the cell surface of an infected cell interact in trans with *PrP^C* on the plasma membrane of an adjacent target cell and promote the initial conversion in the recipient cell and eventual infection? Consistent with this possibility, aldehyde-fixed infected cells are able to infect target cells, albeit at a relative low efficiency [72–74]. In addition, *PrP^{Sc}* thought to be irreversibly bound to physical supports such as stainless steel wires can infect neuroblastoma N2a cells [75]. Later, elegant studies with a cell model expressing an epitope-tagged *PrP^C* formally demonstrated that the first



conversion events occur primarily at the plasma membrane [76, 77]. Nevertheless, the finding that the plasma membrane is the initial site of prion conversion when cells are infected de novo by extracellular prions does not exclude

that conversions can also occur later, in other subcellular compartments, especially along the endocytic pathway [66, 78].

Fig. 1 Cell-to-cell transmission of infectious prions. In infected cells, PrP^C (blue color) and PrP^{Sc} (red color) at the cell surface can be endocytosed, transported to the early endosome (EE) compartments, and recycled through the Rab11-recycling endosomes (RE). After maturation of the EE into the late endosomal multivesicular body compartments (MVB), PrP^C and PrP^{Sc} are recovered on the surface of intra luminal vesicles (ILVs), released in the lumen of the MVB after a mechanism of budding and scission of its limiting membrane. From then, the MVB compartment can travel in the cytoplasm to reach and fuse with the plasma membrane (PM) and release the ILVs as exosomes in the extracellular space. Alternatively, MVBs can also fuse with the phagophore-derived autophagosome structures to form amphisomes those further fuse with lysosomes to form autophago lysosomes. Direct fusion of autophagosomes with lysosomes also occurs. The two latter structures can fuse with the PM and release proteolysis products in the extracellular space. PrP^C and PrP^{Sc} have been detected in all these intracellular compartments. Transmission of infectious prions mediated through cell-cell contacts. Three potential sites of PrP^C to PrP^{Sc} conversion have been proposed. At the plasma membrane or in intracellular compartments, i.e., in recycling endosomes and in late endosomal MVBs. Transmission of infectious prions through cell-cell contacts can be carried out through different pathways mediated by direct close cell-cell contacts and/or synapses (pathways 1a, b) and through tunneling nanotubes (TNTs) either in intra-TNT-Lamp1-lysosomal vesicles (pathway 2a) or possibly through transport at the surface of the TNT (pathway 2b). Transmission of infectious prions mediated through released extracellular vesicles and particles. PrP^C and PrP^{Sc} have been located on the surface of released exosomes and on microvesicles/shedding vesicles after budding from the PM. In addition to the cell-cell contact pathways, the transmission of infectious prions can be mediated through the extracellular medium via extracellular vesicles (EVs) including exosomes and microvesicles (pathways I and II, respectively). EVs can enter the cells through different mechanisms including fusion and endocytosis. The release of membrane-free infectious prion particles through the release of proteolysis products is still elusive but remains possible (pathway III). For the sake of clarity, no intracellular compartment was depicted in the target cell

Cell-to-cell spreading of prions in cultured cells

The wide subcellular distribution of PrP^{Sc} in infected cells offers to prions several possibilities for cell-to-cell spreading. As detailed below, whereas the exact intercellular mechanisms in the CNS remain elusive, experimental evidence with cultured cells indicates that spreading may involve direct cell-cell contacts, nanotubes, and also contact independent mechanisms via secretion of extracellular vesicles (EVs).

Trans-neuronal/transsynaptic spreading

Prions spread both in the CNS and peripheral organs and have been shown to target neuronal and non-neuronal cells. In the brain, the spread of prions along neuronal circuits has been observed for decades, with specific strains targeting specific brain areas. The synapse is an attractive candidate as the vector of neuron-to-neuron spread of pathology. Indeed, in this context, plasma membranes are tightly

linked, and the sequential development of pathology in brain regions supports a trans-synaptic spread scenario. Surprisingly, although prions behave as neurotropic transmissible agents, how they are transported in neurons and whether or not prions are actively transferred through synaptic contact is still unknown. Analysis of PrP^{Sc} spreading along neuronal pathways is made complex by the intrinsically intermingled topology of brain networks and neuroglial interactions. Therefore, to date, the role of synaptic contacts in prion spreading has only been inferred from studies aiming at deciphering the impact of networks topology in prion spreading along neuronal pathways. Several studies showed that, at the single cell level, upon uptake, prion seeds are actively transported in neurons and axons through axonal transport [79, 80]. Yet, evidence gathered from experiments where axonal transport was rationally impaired *in vivo* suggests that PrP^{Sc} can spread in the brain independently of intact axonal conduit [81, 82]. In a recent study, Shearin and Bessen [83] described the temporal and spatial movement of prions from the brain stem along cranial nerves into skeletal muscle. PrP^{Sc} was found in nerve fibers of the tongue 2 weeks prior PrP^{Sc} deposition in skeletal muscle, followed by a replication phase in muscle cells, thus suggesting that transynaptic spread of prions can occur at the neuromuscular junction. Should transynaptic transfer be a crucial mechanism controlling prion spreading in the brain, one could reasonably expect that prion targeting would depend on the region where prion has been initially inoculated. In regard to that hypothesis, conflicting results have been reported in the literature. Indeed, while some studies showed that variations in the infection route significantly impact the endpoint regional distribution of PrP^{Sc} and the phenotype of scrapie strains [84], others suggested that prions have an invariant brain regional distribution that mostly depends on the prion strains [85]. In addition, prion strains efficiently propagate in mice expressing cellular PrP solely in glial cell compartment [86, 87]. The presence of intracellular PrP^{Sc} can also be detected in microglia [88], consistent with a possible role in dissemination within the SNC, but available evidence, rather, suggests that microglia are protective by degrading PrP^{Sc} and slowing down the progression of the disease (for a review, see [89]). While these suggest that prions can spread independently of synaptic connectivity, this does not formally exclude a role for synaptic contacts and neuronal activity in shaping some aspects of prion spreading (pathway 1b in Fig. 1a). In a context where no direct evidence of prion transfer occurring through synapses has been brought forward, a strong argument that prions spread through trans-neuronal and/or trans-synaptic contact would rely on the observation that prion dispersion in the CNS respects brain connectomics and structural connections, as this is the case with strict trans-synaptic neuroviruses such as rabies virus. Yet, considering the mechanisms involved

in prion dispersion and amplification, one could not expect such a straightforward link between structural connectivity and propagation pattern. Indeed, prion propagation involves at least two distinct steps that are necessary but not sufficient. (1) A fast intracellular and trans-cellular spread of PrP^{Sc} aggregates seeds that can occur independently of PrP^C expression. (2) A slow nucleation process in the targeted cell that is strictly dependent on PrP^C expression. Therefore, considering the role of synaptic contact in prion spreading, it is conceivable to postulate that PrP^{Sc} seeds may travel across un-susceptible neurons to reach distant brain area where efficient seeding could take place. Thus, discrepancies between the pattern of prion propagation and synaptic strength do not refute the hypothesis of a synaptic mechanism of trans-neuronal spreading.

Modeling of PrP^{Sc} dispersal in the brain (i.e., axonal transport, trans-neuronal transfer, and target cell PrP^{Sc} amplification through nucleation of prion seeds) would greatly benefit from *in vitro* models allowing to control neuronal connectivity and reconstructs ordered neuronal networks that could be locally infected [90, 91].

Cell-to-cell transfer of prion infection is best analyzed in coculture experiments in which *de novo* infection of naive cells is monitored during culture with prion-infected cells. Several groups, using various cell types and different prion strains, consistently showed that *de novo* infection of new cells is much more efficient when infectivity is administered by living cells rather than by cells killed by various treatments [72–74]. Although these studies did not address the underlying mechanisms, they suggest that, in these experimental conditions, some active biological processes are required in addition to mere *in trans* contacts between closely apposed PrP^C and PrP^{Sc} isoforms (pathway 1a in Fig. 1a). The transfer of plasma membrane fragments might allow PrP^{Sc} to be incorporated in the membrane of a closely apposed acceptor cells. This process, named trogocytosis, occurs at the immune synapse when antigen presenting cells interact with T cells [92], and it has been hypothesized that circulating DCs may exploit such a pathway to transmit PrP^{Sc} [49]. However, experimental evidence that PrP^{Sc} may follow this pathway to move from cell to cell has not yet been obtained.

Extracellular vesicles

The presence of infectivity in the cell culture media of numerous prion-infected cell lines (e.g., [93]) raised the possibility that infection can be transmitted, at least among cultured cells, through the release of cell-free forms of prions. However, the physical nature of secreted prion infectivity has long remained unexplored. In 2004, Fevrier and coworkers first reported that PrP^{Sc} and infectivity actively released from two prion-infected cell lines were in fact associated

with extracellular vesicles (EVs) [94]. These EVs were isolated by differential centrifugation and further purified by sucrose gradients before analysis. Their size, density, morphology, and protein composition indicated their similarity to exosomes, defined as 50- to 90-nm vesicles of endosomal origin that are released into the extracellular environment upon fusion of MVBs with the plasma membrane. These vesicles contained prions, as assessed by detection of aggregated and PK-resistant PrP, were infectious for uninfected cells and transmit prion disease upon inoculation into mice. Exosomes, whose secretion was originally observed during reticulocyte maturation [95], are, in fact, secreted by most (if not all) cultured cells. Indeed, further studies by other groups showed that exosomes released by a variety of different prion-infected cell lines (neuroblastoma cells, hypothalamic GT1-7 cells, fibroblasts, and epithelial cells) do carry PrP^{Sc} and the associated infectivity [96–99]. Finally, infectivity was found in the culture supernatants of freshly isolated splenic cells from infected mice, along with the presence of immunisolated EVs bearing exosome markers [45]. Collectively, these findings firmly establish that the targeting of PrP^{Sc} to the exosomal secretion pathway is a general feature of prions cell cycle, at least in cell lines (pathway I in Fig. 1b). What about brain cells involved in prion multiplication? While brain prions multiply mostly in neurons, there is *in vivo* [100] and *in vitro* [57, 58] evidence that astrocytes also propagate prions. Both primary cultured astrocytes [101, 102] and cortical neurons [103] release EVs, a process regulated by neuronal activity [104]. Therefore, it is likely, although not formally demonstrated, that prions detected in the culture media of both cell types [58, 105] are also associated with EVs.

EV-mediated dissemination of pathogens is not unprecedented. Numerous studies indicate that viruses hijack the host exosomes in multiple ways to increase their persistence, pathogenesis, and transmission [106]. In the recent years, it was recognized that viruses across many different families have evolved to insert numerous viral components in EVs to manipulate the local host environment and promote viral multiplication, leading to the ‘Trojan Exosome Hypothesis’ [107], whereby HIV-1 uses host exosomes for generation of infectious viruses that may use envelope-independent host uptake pathways for entry. Exosome biogenesis and release is a very complex, tightly regulated process which has been recently reviewed [108, 109]. It begins in the endosomal system when the early endosomes mature into late endosomes or multivesicular bodies (MVBs). During this process, cargos are segregated laterally in the endosomal limiting membrane which then invaginates to form and release small intraluminal vesicles (ILVs) in the lumen of the organelle. ILVs-containing MVBs can either fuse to autophagosomes or directly to lysosomes for degradation, or can be transported to the plasma membrane. Transport requires MVBs

interaction with actin and microtubules. Proteins involved in the fusion of MVBs with the plasma membrane include SNAREs, tethering factors, Rabs, and other Ras GTPases. Upon fusion with the cell surface, ILVs are released into the extracellular space where they become bona fide exosomes. Exosomes contain numerous proteins, lipids, and nucleic acids whose nature obviously depends on the producing cell type. There is ample evidence that incorporation of at least some macromolecules into ILVs is a selective process, but the underlying mechanisms are poorly understood. As a result, some cargoes are enriched in EVs, while others are under-represented. The endosomal sorting complex responsible for transport (ESCRT) machinery is composed of four multiprotein complexes (ESCRT-0, -I, -II, and -III, with other accessory proteins such as Alix and VPS4). This machinery, well described in yeast, is responsible for the recognition and the sequestration of ubiquitinated proteins, the invagination, and the scission of the membrane to finally release ILVs into the lumen [110]. However, ESCRT-independent pathways for MVBs formation have been described [111] that may require ceramide production in some cell lines [112] or tetraspanins [113, 114].

Different studies revealed that cellular stress can enhance the release of exosomes [108]. One possible explanation is that the release of exosomes (or EVs) may contribute to eliminate toxic products. Interestingly, Fader and coworkers observed that induction of the autophagy process inhibits its exosome secretion by stimulating the fusion of MVBs with autophagosomes to form amphisomes, thus suggesting that MVB biogenesis and autophagy are two tightly linked processes [115]. This was also confirmed by inhibition of ESCRT components resulting in autophagy inhibition and accumulation of protein aggregates [16, 117]. As expected, the inhibition of the autophagy process was found to favor the release of exosomes [108]. Interestingly, intracellular PrP^{Sc} level was also modulated by autophagy. Induction of autophagy reduces intracellular PrP^{Sc} level, whereas its inhibition leads to PrP^{Sc} accumulation [118, 119]. The impact of autophagy inhibition on the release of EVs associated prion infectivity/PrP^{Sc} has not yet been reported.

Arellano-Anaya and coworkers studied the efficiency of prion exosomal secretion using a single cell type (epithelial RK13 cells) infected by three different prion strains [25], and demonstrated that exosome preparations were infectious in each paradigm. Interestingly, using a cell-based assay to compare the relative infectivities, they showed that one strain was much more efficiently secreted (20–40-fold) than the two others [20]. As detailed before, strain-specific PrP^{Sc} assemblies that breed true via self-templating are thought to represent the molecular basis of the phenotypically different prion strains. Fractionation of PrP^{Sc} by velocity and equilibrium sedimentations showed marked strain-dependent variations of infectivity, most probably related to the different

sizes that PrP^{Sc} entities can adopt [80, 121]. Clustering of proteins at the plasma membrane stimulates their targeting to exosomes [122, 123], indicating that aggregation of proteins may act as a general signal for exosomal sorting. Although the mechanisms by which PrP^{Sc} is targeted to the exosomal pathway remain to be established (see below), these findings raise the possibility that some prion strains may display PrP^{Sc} molecular arrangements more prone to efficient targeting to the exosomes constitutively secreted by the RK13 cell line.

Apart from carrying PrP^{Sc} and associated infectivity, there is evidence that EVs released from infected cells may differ in other ways. Coleman and coworkers analyzed gradient-purified EVs released by GT1-7 cells. Cryo-electron tomography revealed spherical vesicles of diverse sizes and surprisingly with different membrane structures, i.e., vesicles with 1, 2, or 3 membranes. Interestingly, the set of secreted EVs subpopulations (in terms of size and of number of membranes) was affected by prion infection [97]. However, it is not known to which extent these observations are specific to GT1-7 cells and whether the subpopulations with altered features are actually those carrying PrP^{Sc}. The same group further showed that EVs from infected GT1-7 cells carried a distinct signature of miRNAs, some of which being up-represented and others under-represented [44]. The miRNA profile appeared to be different in EVs and in the secreting cells, illustrating that incorporation into ILVs is selective rather than random. Whether PrP^C and/or PrP^{Sc} are directly involved in miRNA selection deserves further investigation. In addition, whether miRNAs profiling may eventually lead to sensitive preclinical diagnosis of prion infections *in vivo* is far from being established.

In oligodendroglial cells, functional impairment of some components of the ESCRT machinery showed that exosomal release of the proteolipid protein (PLP) was ESCRT-independent. Instead, the sphingolipid ceramide was identified as an alternative pathway for the sorting of PLP into membrane domains to be selected for inward budding into MVBs [112]. Guo and colleagues provided evidence that such a mechanism is also involved for targeting PrP^C and PrP^{Sc} to exosomes. Treatment of GT1-7 cells with the GW4869 inhibitor of the ceramide-producing nSMase pathway lowered the release of exosomes and PrP^C. When the cells were infected with mouse prions, GW4869 treatment also diminished the exosomal secretion of PrP^{Sc} [125]. In a follow-up study, the same group showed that treatment of prion-infected cells with the ionophore monensin, previously shown to stimulate exosomes release from K562 cells [126], increased exosomal secretion of PrP^{Sc}, and associated infectivity, as detected by a transwell assay [127]. In another study involving two cell lines infected with ovine prions, genetic or pharmacological targeting of the exosomal pathway efficiently inhibited the release of prions

[71]. Inhibition of the ESCRT-I tsg101 (described to inhibit exosomes release from HeLa CIITA cells [110]) or GW4869 treatment strongly inhibited the release of prions. Down-regulation of tsg101 had no detectable impact on prion propagation in the transduced cells, but exosomal release of PrP^C, alix, PrP^{Sc}, and associated infectivity were strongly inhibited. Finally, GW4869 treatment did not, or only marginally, affect the release of exosomal proteins (including PrP^C), but the release of PrP^{Sc} and infectivity was dramatically inhibited, suggesting that PrP^{Sc} was selectively excluded from the secreted exosomes. Collectively, these different studies indicate that exosomal secretion of prions is amenable to experimental intervention. Furthermore, the possibility that PrP^{Sc} may be selectively excluded from secreted exosomes provides potential tools for *in vivo* interventional strategies.

Striking morphological and biochemical diversity is observed upon analysis of EVs from bodily fluids or from cultured cells [128, 129]. Such heterogeneity is also observed for MVBs as cells can contain different MVBs, each harboring ILVs with various sizes, suggesting distinct mechanism of formation/secretion and distinct functional properties [110, 114, 130]. In this context, whether PrP^{Sc} is widely distributed among EVs or is associated with a small subset of EVs is unknown. However, purification of PrP^{Sc}-bearing EVs will be very challenging as no antibody specific for the abnormal form of PrP is readily available and because immunodetection of PrP^{Sc} requires strong denaturation by chaotropic agents to expose buried epitopes.

Whether prion infection might stimulate EVs release has not yet been thoroughly addressed. Tunable-resistive pulse-sensing analysis showed that size distributions and EVs numbers were similar for infected and uninfected GT1-7 cells [125]. In several other studies, estimation of EVs release was inferred from immunoblotting analysis of EVs proteins in the 100K pellet fractions. These analyses did not provide any evidence for an infection-mediated increase of EVs [71, 120, 124]. However, if PrP^{Sc} is associated with a small subset of EVs, a potential stimulation of their release may have been not detected by immunoblotting analysis of the whole EVs population.

It is important to note that prions hijacking of the exosomal pathway do not imply that the endosomal pathway is the only route for extracellular release of prions. Indeed, exosomes have long been described as small vesicles requiring high speed (e.g., 100,000×g) to pellet, while microvesicles budding at the plasma membrane are considered bigger and can be pelleted at intermediate g forces (e.g., 10,000×g). However, the strict separation of these vesicle types by size has not been established beyond doubt [18], and it is increasingly recognized that (1) exosomes preparations may also contain small vesicles (< 100 nm) budding at the plasma membrane [31], (2) vesicles with exosomes markers may be larger than 100 nm in size. Therefore, it cannot be

excluded that small infectious EVs budding at the plasma membrane of infected cells may also be present in exosomes preparations. There are also suggestions that infected cells may release large infectious EVs derived from the plasma membrane (pathway II in Fig. 1b). Mattei and coworkers used media conditioned by mouse neuroblastoma cells infected with a mouse prion strain to show that EVs pelleted after centrifugation at intermediate speed (20,000×g) contained PrP^{Sc} and infectivity [132]. A similar finding was reported with epithelial Rov cells infected with sheep prions [120]. Conditioned media were serially centrifuged with increasing g forces (2000×g, 10,000×g, 100,000×g), and all the resulting supernatants and pellets were tested for prion infectivity. The vast majority of infectivity required 100,000×g ultracentrifugation to be pelleted, confirming the previous work on the association of prions with exosomes [94]. However, detectable levels of infectivity were documented in 2000×g and 10,000×g pellets, consistent with large EVs, possibly budding at the plasma membrane. It should be noted, however, that, in these two studies, the preparations containing large EVs were not characterized in depth. A further pathway for potential prion dissemination was identified by showing that virus infection strongly stimulates the release of PrP^{Sc} and infectivity through their incorporation not only in exosomes but also on the retroviral particles [98]. However, there is currently no suggestion that prion pathogenesis may be affected by prion-transporting viruses, since coinfection of mice with prions and Murine Leukemia retroviruses did not change the incubation period to clinical prion disease [133, 134].

Collectively, this substantial body of studies firmly points to the fact that secretion through association with EVs is a general feature of the prion life cycle. The ongoing studies suggest that experimental tools are being identified to manipulate/interfere with prion secretion. EVs being potential vehicles for prion spreading *in vivo* are an appealing hypothesis that has to be substantiated by experimental studies in animals.

Tunneling nanotubes

Tunneling nanotubes (TNTs), originally observed and described in animal cells by Rustom and colleagues [35], are transient cytoplasmic extensions that bridge two distant cells together. TNTs consist in open-ended channels, typically 50–200 nm in diameter, although 800 nm in thickness can be observed [36]. These structures contain F-actin and, in contrast to filopodia, are not attached to the substratum. TNTs are not empty tubes as they allow the transfer of whole organelles (mitochondria, lysosomes, and different types of vesicles) and also of proteins, lipids, nucleic acids, and other signaling factors [37]. Based on time-lapse imaging, two non-mutually exclusive models

have been proposed for TNT formation [38]. The actin-driven protrusion mechanism involves the outgrowth of a protrusion that will eventually fuse with the plasma membrane of a distant cell. In the cell-dislodgment mechanism, typical of motile cells, cells are in close apposition and TNT is formed when the two cells migrate away from each other. Numerous pathogens use TNTs to spread between cells. For instance, bacteria or HIV can surf on the surface of TNTs [139, 140]. In addition, either whole viral particles or viral genomes and replication components are detected within TNTs in cells infected by a variety of viruses, including retroviruses [141], herpes [142], influenza [143], or PRRSV [144]. The first evidence for a link between cell-to-cell spreading of prions and TNTs came in the late 2000s [145] (pathway 2 in Fig. 1a). The group of C. Zurzolo showed that cultured mouse neuron-like CAD cells establish numerous TNT-like structures and that the PrP^C protein can move from one cell to another via TNT [at the surface of the TNTs (pathway 2b) or through vesicles transport of inside the TNTs (pathway 2a)]. In coculture experiments PrP^{Sc} endogenously produced by infected CAD cells was found to travel within vesicles inside the TNTs connecting infected cells to uninfected CAD cells [145]. Dendritic cells are known to form TNTs [146, 147] and are involved in prion transport from the gut to the lymphoid organs [46, 148] in which follicular dendritic cells will actively multiply prions. As detailed before, whether dendritic cells could also deliver prions to the lymphoid peripheral nervous system is controversial [50, 51]. To model this situation, the authors established co-cultures between bone-marrow-derived dendritic cells (BMDCs) and hippocampal or granule primary neurons. Since chronically infected BMDCs are not available, BMDCs were loaded with purified, Alexa-labeled PrP^{Sc} before cocultivation. TNTs between BMDCs and neurons were observed, in which the exogenously added Alexa-labeled PrP^{Sc} was imaged in association with LysoTracker-positive vesicles. Further experiments showed that neurons exposed to loaded BMDCs became infected [45]. This study provided evidence that PrP^{Sc} can use TNTs for intercellular spreading between neuronal CAD cells, and suggested that TNT transfer of PrP^{Sc} might also operate between BMDCs and neurons. Because loading cells with high amounts of purified, labeled PrP^{Sc} may be seen as an artificial system to study the transfer of endogenously produced PrP^{Sc}, the same group turned to infected astrocytes as a more relevant way to deliver prions to uninfected astrocytes or neurons. Infected primary cerebellar astrocytes were co-cultured with Cell-Tracker Green labeled uninfected astrocytes. Transfer of PrP^{Sc} was observed in the recipient astrocytes and some of the numerous PrP^{Sc}-stained intercellular connections were true TNTs [105]. To model the potential transfer of prions between

astrocytes and neurons in the brain, prion-infected astrocytes were co-cultured with cerebellar granule primary neurons. Transfer of PrP^{Sc} from astrocytes to neurons did occur, but no positive indication for a TNT-mediated transfer was provided in this particular setting [105].

The favored current hypothesis is that TNT-mediated spreading of PrP^{Sc} occurs through the transfer of PrP^{Sc}-containing endocytic vesicles within the lumen of TNTs [149]. How PrP^{Sc} eventually escapes these vesicles to interact with PrP^C in the recipient cells is not yet known. However, TNTs also results in plasma membrane fusion allowing continuity between two cells, providing the opportunity for cell surface PrP^{Sc} to travel and reach the plasma membrane of the naïve cell (pathway 2b in Fig. 1a). Since time-lapse imaging showed that PrP^{Sc}-containing cell surface entities, named "strings", are relatively immobile (less than 3 µm per 5 min) [150], it has been argued that the dynamic and transient nature of TNTs may not allow the long-distance travelling of PrP^{Sc} strings on the surface of TNTs [149]. On the other hand, the fact that PrP^{Sc} strings seem to be poorly endocytosed and thus remain on the cell surface for long periods of time [150] may give them the opportunity to be passively transported on a growing membrane protrusion towards a new cell. After fusion with the contacting plasma membrane, it may promote PrP^C conversion within the plasma membrane [76, 151].

There are some suggestions that prion infection might stimulate TNT formation and vesicles transfer between CAD cells. In prion-infected CAD cultures, the percentage of TNT-forming cells was increased by 20% compared to uninfected controls [49]. One may see TNT-mediated transfer as a mean to get rid of aggregated PrP^{Sc} (or possibly damaged PrP^{Sc}-containing lysosome) and/or acquisition by infected cells of organelles from healthy, non-infected ones. In any case, the mechanisms leading to induction of TNT formation are under investigation. The current hypothesis involves aggregation-mediated stress (through ROS and/or induction of unfolded protein response) possibly leading to stressed or damaged lysosomes [52].

It has been argued that TNTs may be more efficient than EVs to transfer prions, at least in some experimental cell models [105, 145]. This is based on the fact that crude-conditioned media are apparently less efficient than TNTs to infect new cells, and that EVs must be concentrated to detect their infectious potential. It must be pointed that **in vivo and notably in solid tissue, the local concentrations of secreted EVs are probably much higher than in in vitro settings where released vesicles are highly diluted in the cell culture medium.** However, the relative contribution of EVs versus TNTs may not be pertinent and crucial questions **unless these mechanisms are actually relevant to the in vivo situation.**

EVs and TNTs in vivo

While the involvement of EVs or TNTs for cell-to-cell spreading of prions is well documented in cultured cells, **corroboration to the in vivo situation is a significant challenge**. As detailed below, EVs are widespread in the organisms, but there is so far very little evidence for infectious EVs in infected individuals. In addition, the possible contribution of infectious EVs to the spread of prions **in vivo has not yet been addressed experimentally**. Regarding TNTs, the situation is even more challenging as these peculiar structures are notoriously difficult to detect **in vivo and because experimental tools specifically targeting TNTs functionality are still lacking**.

In vivo, EVs can be isolated from most biological fluids, including blood and plasma, urine, cerebrospinal fluid, milk, or saliva. The PrP^C protein is detected in these **in vivo-derived EVs preparations (notably urine [153], plasma [154–156], cerebrospinal fluid [157], and milk [158]**. Importantly, several of them (urine, cerebrospinal fluid, saliva, blood, plasma, and milk) become infectious during the course of prion diseases [59–163], consistent with a possible contribution of EVs to the infectivity of these fluids. However, there are yet very few published studies unambiguously showing that thoroughly purified, **in vivo-derived EVs are associated with PrP^{Sc}/infectivity**. Two groups reported that EVs isolated from plasma of infected animals were positive for prions. In one study, EVs were isolated from the plasma of infected mice. These preparations did not transmit disease upon inoculation into further mice [164]. However, the same or similar preparations had seeding activity when subjected to amplification by PMCA reactions [164, 165], prompting the authors to conclude that PrP^{Sc} is associated with plasma EVs. While these studies confirmed the previous work, indicating that plasma contains prion infectivity [160], it is our opinion that these data should be interpreted with caution. Indeed, EVs were isolated by precipitation of crude plasma with a commercial polymer. This reagent is very efficient at precipitating EVs from biological fluids, but these preparations also contain a number of other plasma components (see the position paper of the International Society for Extracellular Vesicles [166]), as illustrated by the heavy contamination of their EVs fractions by immunoglobulins [165]. Since the possible contribution of contaminants to the seeding activity of the so-called plasma exosome fractions was not assessed, further purification of EVs is required to conclusively show that the seeding activity is actually associated with EVs. In another study, EVs were isolated from plasma of hamsters by differential ultracentrifugation and further purified by flotation on a sucrose gradient. In these conditions, plasma EVs from uninfected

animals were recovered in fractions from 1.11 to 1.57 g/ml as assessed by immunoblotting and immune-electron microscopy. When the starting material was plasma from prion-infected hamsters, PrP^{Sc} was successfully identified by western blot in the EVs-containing fractions [167]. Although the infectivity of these fractions was not reported, **this work suggests that in vivo-generated EVs may carry prions**, a finding that has now to be confirmed and generalized in other animal models of TSE. Interestingly, recent accumulating evidence shows that EVs can cross the blood–brain barrier from both directions, with EVs from neuronal origin being possibly recovered in blood [168] as well as with EVs from peripheral origin also detected in the CNS [169, 170]. Further time-course experiments should reveal whether blood infectious EVs are detected late in the disease (i.e., subsequently to neuroinvasion), or if their peripheral production is an early event, possibly contributing to CNS infection.

Intercellular communication in brain parenchyma occurs through many mechanisms which involves electrical and neurochemical coupling through synaptic structures, as well as complex neuron–glia interactions. EVs-mediated transfer of cell-derived material such as RNA, proteins, or mitochondria has been recently documented in physiological or pathological conditions between glial cells and neurons [171–174], suggesting that EVs play a role in neuroglial communication. While EVs can readily be purified from the interstitial fluid of brain tissue [175], it is currently not yet known whether such EVs might carry prions when isolated from infected animals.

Since their original description, TNTs as a mode of communication between cultured cells has gained a huge attention [137]. **Because the in vivo detection of these peculiar structures is extremely challenging, their biological relevance in vivo remains an open question, especially in solid tissues [176]**. Indeed, only a few studies reported on their identification in mammalian tissue, including developing embryonic tissues [177, 178], between dendritic cells in the mouse cornea [47], in human mesothelioma, lung, and ovarian tumors [179, 180]. The lack of TNT markers and the optical technical limitations to detect TNTs in solid tissues along with the harsh conditions required to immunodetect PrP^{Sc} **are likely to make in vivo detection of prion-containing TNTs particularly difficult**.

Generalization to misfolded proteins associated with other neurodegenerative diseases

The prion paradigm was recently extended to a large spectrum of other neurodegenerative diseases including synucleinopathies (Parkinson disease: PD, Lewy body dementia:

LBD or multiple systemic atrophy: MSA, amyotrophic lateral sclerosis: ALS, frontotemporal lobar degeneration: FTL, tauopathies, Alzheimer disease: AD and Huntington disease: HD). It is important to note that while a wealth of epidemiological and experimental evidence has demonstrated that prions are infectious in animals including humans, there is so far no epidemiological evidence that AD, synucleinopathies, and tauopathies are transmissible among humans by iatrogenic procedures or other routes [81]. Nevertheless, these pathologies display striking similarities with prion diseases. First, they are all characterized by inclusions or deposits of aggregated, misfolded proteins into specific brain areas. In addition, pathological lesions develop sequentially in anatomically connected brain regions during the course of the disease, thus strongly suggesting a step-by-step spreading mechanism [82, 183]. Interestingly, *in vitro* and *in vivo* investigations revealed that the culprit aggregated proteins or peptides (α -synuclein: asyn [84, 185] in synucleinopathies; superoxide dismutase-1: SOD-1 [86, 187], TAR-DNA-binding protein 43: TDP-43 [188], FUS [189, 190], or the C9orf72-associated dipeptide repeats: DPR [191, 192] in ALS; huntingtin [193, 194] in Huntington disease or tau [195–197] and $A\beta$ amyloid peptide [198, 199] in tauopathies and AD) all display seeding properties towards their normal counterparts. While all of these proteins were recovered in the extracellular space including cell culture supernatants of disease cellular models or biological fluids like CSF or blood (reviewed in [200]), it was also observed that $A\beta$ [201], asyn [202], tau [203], SOD1 [204], TDP-43 [205], Fus [206], the DPR [207], or the huntingtin [193, 208] proteins were all found to be released in association with EVs (for a review, see [209]). Collectively, these studies have led to the pathogenic protein spreading hypothesis which posits that abnormal forms of proteins move from neuron to neuron to induce aggregation and spatiotemporal progression of the disease [82]. However, it is important to note that selective neuronal vulnerability may also be an important driving force for the sequential progression of brain pathology [210].

Interestingly, experimental research on this group of proteins has yielded evidence supporting a trans-synaptic spread scenario of the associated pathologies. Indeed, the sequential apparition of neuronal lesions containing aggregated forms of these proteins in patients' brains can be linked to neuro-anatomical connections [183]. Moreover, a number of these proteins are present or even enriched in synapses, supporting the hypothesis that this subcellular compartment could be the site of early seeding events [211–215]. In addition, synapses may be a hot spot of intercellular exchange of material. It has, indeed, been shown that signaling molecules such as Wnt could be transferred between neurons in a trans-synaptic fashion in *Drosophila*, putatively through EVs [216]. Interestingly,

neuronal activity has been shown to control the production and release of synaptic $A\beta$ peptides [217–219], and more recently tau and asyn [220, 221]. A number of studies following injection of synthetic or bonafide asyn aggregates have showed that the site of injection preconditioned the regions to which pathology could spread, thus supporting a trans-synaptic scenario [185, 222, 223]. The patterns of aggregation spreading that were observed were compatible with one or more trans-synaptic jumps. Importantly, an elegant set of experiments performed by Calafate and colleagues demonstrated that the presence of synaptic contacts increased the spreading of tau aggregation between neurons [224]. Taken together, these results support a role for synaptic structures in the spread of pathology in tauopathies and synucleinopathies, but as argued by Walsh and colleagues, "the incredible complexity of neuronal connectivity in the human nervous system suggests that almost any regional pattern of lesions that one might observe could be said to follow some neuro-anatomical pathways" [210]. Besides, experimental evidence obtained in Brahic's lab showed that asyn synthetic fibrils could be transported from axons to the somatodendritic compartments as well as the other way around, and then secreted in the extracellular medium [225]. They also demonstrated that neuron-to-neuron transfer of these fibrils could occur in an immature network, thus supporting the existence of non-synaptic spread mechanisms [226].

Strikingly, a number of studies have now shown that EVs isolated *in vivo*, from either patients or animal models, contain aggregated proteins or peptides and/or are able to seed further aggregation *in vivo* or in reporter cell lines. EVs isolated from brain extracellular space of transgenic mice expressing the human tau with the P301L hereditary tauopathy mutation carry tau seeds triggering further aggregation in tau biosensor cells [227]. In addition, EVs isolated from brain of LBD patients contained asyn, $A\beta$, and phospho-tau, and induced host asyn aggregation when stereotactically injected into the brain of wild-type mice [228]. In other studies, EVs from brains of AD patients or from transgenic mice expressing mutated APP contain forms of APP and $A\beta$ amyloid peptide [175, 228]. These findings show that brain EVs could potentially shuttle these abnormal proteins/peptides and participate in their dissemination within the brain. Notably, EVs bearing aggregated proteins/peptides were also detected in biological fluids such as blood or CSF. EVs isolated from the CFS of patients with PD and LDB, but not those from control subjects, were able to seed asyn oligomerization in a reporter cell line [229]. EVs from CSF of ALS-FTD patients were enriched in C-terminal fragments of TDP-43 and induced further aggregation and mislocalization in target glioblastoma cells [230]. Specific increase in phosphor-tau was detected in EVs from CSF patients with the early AD [231]. Similarly, increase of phosphor-tau or

A β was observed with EVs from blood of preclinical or declared Alzheimer's patients [232].

In contrast to prions, where non-vesicular release of PrP^{Sc} has not been readily characterized (pathway III in Fig. 1b), pathological seeds can also be recovered in the extracellular environment as free aggregates, released through a direct translocation from the cytoplasm across the plasma membrane via the endosomal exocytosis, the lysosomal secretory pathway, or after synaptic release or cell death. This was well depicted for TDP-43 [233] and for huntingtin [94, 234, 235], but similar results have been also extended for other proteins like SOD1 [204], tau [236, 237], asyn [202], and the A β amyloid peptide [98].

Similar to infectious prions, there is also evidence that TNTs might participate to the spreading of protein aggregates associated with these neurodegenerative diseases [152]. In U251 glioblastoma cells, endogenous TDP-43 aggregates were visualized within TNTs connecting the cells [230]. In CAD cells, expression of polyglutamine huntingtin resulted in the transfer of aggregates from the transfected cells to naïve CAD cells and TNTs containing aggregates were imaged [238]. Similar findings were obtained with CAD cells [239] or human astrocytes [240] loaded with fluorescent aggregated fibrils of asyn, and also in CAD cells exposed to fluorescent tau fibrils [41]. Fibrils aggregates also spread between primary neurons in culture [8, 239], but due to the lack of specific marker to image TNTs in the dense primary cultures, only a single study has so far provided positive indication for a TNT-mediated transfer between these biologically relevant cells [41].

In conclusion, these studies indicate that EVs and TNTs can mediate the intercellular transfer of misfolded proteins with seeding activities and toxic properties. They suggest that beyond PrP^{Sc} spread in prion diseases, these pathways may contribute to pathology progression in a wide range of neurodegenerative diseases associated with protein misfolding.

Future directions

As detailed above, studies from independent groups working with different cell models infected with various murine and ovine prion strains have provided compelling evidence that prions can exploit secreted EVs and/or TNTs to move from cell to cell. There is some suggestion that the efficiency of PrP^{Sc} targeting to EVs may be strain-dependent [20]. The recent discovery that astrocytes derived from human induced pluripotent stem cells can be infected with CJD prions [7] should enable confirmation that EV- and/or TNT-mediated transfer holds true for human prions as well. An exciting yet challenging area for further research will be to establish the biological relevance of these mechanisms in the progression

of prion diseases in vivo. If infectious EVs contribute to cell-to-cell dissemination, targeting the recruitment of PrP^{Sc} to the extracellular vesicles might have a therapeutic potential. Supports for such a strategy have been reported in two neurodegenerative mice models where inhibition of exosomes releases reduced A β plaque load [42] or progression of tau pathology [243]. On the other hand, if exosomes release contributes to the cellular clearance of aggregated proteins, its inhibition could potentially provoke adverse effects on the cells homeostasis [44]. Regarding prions, the proportion of intracellular PrP^{Sc} released through EVs is very low (a few percent or even less) [94, 120]. Inhibition of PrP^{Sc} release on its intracellular steady-state levels and cellular homeostasis should be very limited and represents a possible strategy to limit its dissemination. Should we get evidence that infectious EVs are causally involved in intercellular transfer of PrP^{Sc} during prion pathogenesis, further research to inhibit EVs interactions with target cells would be prompted. Further basic research on TNTs formation and in vivo imaging is expected to provide the crucially required experimental tools to establish their actual contribution to prion pathogenesis.

Acknowledgements We thank Marie-Christine Miquel for comments and for carefully reading the manuscript.

Note added in proof: After acceptance of this manuscript, Abdulrahman B.A. et al. reported that autophagy controls exosomal release of prions. The reference of the corresponding study is: Abdulrahman BA, Abdelaziz DH, Schatzl HM. J Biol Chem. 2018 Apr 26. pii: jbc.RA117.000713. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117000713>. [Epub ahead of print].

References

- Collinge J (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24:519–550
- Aguzzi A, Calella AM (2009) Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* 89:1105–1152
- Weissmann C (2004) The state of the prion. *Nat Rev Microbiol* 2:861–871
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13363–13383
- Prusiner SB, Cochran SP, Groth DF, Downey DE, Bowman KA et al (1982) Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann Neurol* 11:353–358
- Liberski PP, Sikorska B, Brown P (2012) Kuru: the first prion disease. *Adv Exp Med Biol* 724:143–153
- Gajdusek DC (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197:943–960
- Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD et al (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121:419–420
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K et al (1996) A new variant of Creutzfeldt–Jakob disease in the UK. *Lancet* 347:921–925
- van Keulen LJ, Bossers A, van Zijderveld F (2008) TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet Res* 39:24

11. Haley NJ, Hoover EA (2015) Chronic wasting disease of cervids: current knowledge and future perspectives. *Annu Rev Anim Biosci* 3:305–325
12. Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309–1311
13. Vilette D (2008) Cell models of prion infection. *Vet Res* 39:10
14. Arellano-Anaya ZE, Savistchenko J, Mathey J, Huor A, Laroux C et al (2011) **A simple, versatile and sensitive cell-based assay for prions from various species.** *PLoS One* 6:e20563
15. Klohn PC, Stoltze L, Flechsig E, Enari M, Weissmann C (2003) A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11666–11671
16. Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C (2005) **In vitro generation of infectious scrapie prions.** *Cell* 121:195–206
17. Choi JK, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Gambetti P et al (2016) Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:13851–13856
18. Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J (2010) Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327:1132–1135
19. Soto C (2011) Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends Biochem Sci* 36:151–158
20. Bruce ME (1993) Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull* 49:822–838
21. Morales R, Abid K, Soto C (2007) The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta* 1772:681–691
22. Chesebro B (1998) BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science* 279:42–43
23. Bruce ME, Dickinson AG (1987) Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *J Gen Virol* 68(1):79–89
24. Arima K, Nishida N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Atarashi R et al (2005) **Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently infected cell cultures.** *J Virol* 79:7104–7112
25. Courageot MP, Daude N, Nonno R, Paquet S, Di Bari MA et al (2008) A cell line infectible by prion strains from different species. *J Gen Virol* 89:341–347
26. Castilla J, Morales R, Saa P, Barria M, Gambetti P et al (2008) Cell-free propagation of prion strains. *EMBO J* 27:2557–2566
27. Bessen RA, Marsh RF (1994) Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68:7859–7868
28. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I et al (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389(448–450):526
29. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H et al (1998) **Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations.** *Nat Med* 4:1157–1165
30. Tixador P, Herzog L, Reine F, Jaumain E, Chapuis J et al (2010) The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathog* 6:e1000859
31. Mabbott NA (2017) Immunology of prion protein and prions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 150:203–240
32. Glaysher BR, Mabbott NA (2007) Role of the GALT in scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J Immunol* 178:3757–3766
33. Brown KL, Stewart K, Ritchie DL, Mabbott NA, Williams A et al (1999) **Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells.** *Nat Med* 5:1308–1312
34. Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J (1991) Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt–Jakob disease. *J Virol* 65:6292–6295
35. **Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, Klein MA, Mackay F et al (2000) Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells.** *Science* 288:1257–1259
36. Lorenz RG, Newberry RD (2004) Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1029:44–57
37. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP (1996) Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86:345–348
38. Foster N, Macpherson GG (2010) Murine cecal patch M cells **transport infectious prions in vivo.** *J Infect Dis* 202:1916–1919
39. **Takakura I, Miyazawa K, Kanaya T, Itani W, Watanabe K et al (2011) Orally administered prion protein is incorporated by M cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice.** *Am J Pathol* 179:1301–1309
40. **Hepner FL, Christ AD, Klein MA, Prinz M, Fried M et al (2001) Transepithelial prion transport by M cells.** *Nat Med* 7:976–977
41. **Donaldson DS, Kobayashi A, Ohno H, Yagita H, Williams IR et al (2012) M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis.** *Mucosal Immunol* 5:216–225
42. Donaldson DS, Sehgal A, Rios D, Williams IR, Mabbott NA (2016) Increased abundance of M cells in the gut epithelium dramatically enhances oral prion disease susceptibility. *PLoS Pathog* 12:e1006075
43. **Kujala P, Raymond CR, Romeijn M, Godsave SF, van Kasteren SI et al (2011) Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites.** *PLoS Pathog* 7:e1002449
44. **Okamoto M, Furuoka H, Horiuchi M, Noguchi T, Hagiwara K et al (2003) Experimental transmission of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) in the small intestinal epithelial cells of neonatal mice.** *Vet Pathol* 40:723–727
45. **Castro-Seoane R, Hummerich H, Sweeting T, Tattum MH, Linehan JM et al (2012) Plasmacytoid dendritic cells sequester high prion titres at early stages of prion infection.** *PLoS Pathog* 8:e1002538
46. **Raymond CR, Aucouturier P, Mabbott NA (2007) In vivo depletion of CD11c⁺ cells impairs scrapie agent neuroinvasion from the intestine.** *J Immunol* 179:7758–7766
47. Heinen E, Bosseloir A, Bouzahzah F (1995) Follicular dendritic cells: origin and function. *Curr Top Microbiol Immunol* 201:15–47
48. Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C et al (2000) **Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface.** *J Immunol* 165:1259–1265
49. Klohn PC, Castro-Seoane R, Collinge J (2013) Exosome release from infected dendritic cells: a clue for a fast spread of prions in the periphery? *J Infect* 67:359–368
50. **Aucouturier P, Geissmann F, Damotte D, Saborio GP, Meeker HC et al (2001) Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie.** *J Clin Invest* 108:703–708
51. **Raymond CR, Mabbott NA (2007) Assessing the involvement of migratory dendritic cells in the transfer of the scrapie agent from the immune to peripheral nervous systems.** *J Neuroimmunol* 187:114–125
52. **Prinz M, Heikenwalder M, Junt T, Schwarz P, Glatzel M et al (2003) Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion.** *Nature* 425:957–962
53. **McCulloch L, Brown KL, Bradford BM, Hopkins J, Bailey M et al (2011) Follicular dendritic cell-specific prion protein (PrP) expression alone is sufficient to sustain prion infection in the spleen.** *PLoS Pathog* 7:e1002402

54. Glatzel M, Aguzzi A (2000) PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol* 81:2813–2821
55. Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P et al (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339–1347
56. Grassmann A, Wolf H, Hofmann J, Graham J, Vorberg I (2013) Cellular aspects of prion replication in vitro. *Viruses* 5:374–405
57. Krejciova Z, Alibhai J, Zhao C, Krencik R, Rzechorzek NM et al (2017) Human stem cell-derived astrocytes replicate human prions in a PRNP genotype-dependent manner. *J Exp Med* 214:3481–3495
58. Cronier S, Laude H, Peyrin JM (2004) Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12271–12276
59. Krauss S, Vorberg I (2013) Prions ex vivo: what cell culture models tell us about infectious proteins. *Int J Cell Biol* 2013:704546
60. Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23–231). *FEBS Lett* 413:282–288
61. Campana V, Sarnataro D, Zurzolo C (2005) The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol* 15:102–111
62. Clarke MC, Millson GC (1976) The membrane location of scrapie infectivity. *J Gen Virol* 31:441–445
63. Klein TR, Kirsch D, Kaufmann R, Riesner D (1998) Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol Chem* 379:655–666
64. Prusiner SB, Hadlow WJ, Eklund CM, Race RE (1977) Sedimentation properties of the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:4656–4660
65. Gabizon R, Prusiner SB (1990) Prion liposomes. *Biochem J* 266:1–14
66. Veith NM, Plattner H, Stuermer CA, Schulz-Schaeffer WJ, Burke A (2009) Immunolocalisation of PrPSc in scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells by light and electron microscopy. *Eur J Cell Biol* 88:45–63
67. Peters PJ, Mironov A Jr, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E et al (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162:703–717
68. Marjanovic Z, Caputo A, Campana V, Zurzolo C (2009) Identification of an intracellular site of prion conversion. *PLoS Pathog* 5:e1000426
69. Godsave SF, Wille H, Kujala P, Latawiec D, DeArmond SJ et al (2008) Cryo-immunogold electron microscopy for prions: toward identification of a conversion site. *J Neurosci* 28:12489–12499
70. Yim YI, Park BC, Yadavalli R, Zhao X, Eisenberg E et al (2015) The multivesicular body is the major internal site of prion conversion. *J Cell Sci* 128:1434–1443
71. Vilette D, Laulagnier K, Huor A, Alais S, Simoes S et al (2015) Efficient inhibition of infectious prions multiplication and release by targeting the exosomal pathway. *Cell Mol Life Sci* 72:4409–4427
72. Kanu N, Imokawa Y, Drechsel DN, Williamson RA, Birkett CR et al (2002) Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr Biol* 12:523–530
73. Langevin C, Gousset K, Costanzo M, Richard-Le Goff O, Zurzolo C (2010) Characterization of the role of dendritic cells in prion transfer to primary neurons. *Biochem J* 431:189–198
74. Paquet S, Langevin C, Chapuis J, Jackson GS, Laude H et al (2007) Efficient dissemination of prions through preferential transmission to nearby cells. *J Gen Virol* 88:706–713
75. Weissmann C, Enari M, Klohn PC, Rossi D, Flechsig E (2002) Transmission of prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(Suppl 4):16378–16383
76. Goold R, Rabbanian S, Sutton L, Andre R, Arora P et al (2011) Rapid cell-surface prion protein conversion revealed using a novel cell system. *Nat Commun* 2:281
77. Goold R, McKinnon C, Rabbanian S, Collinge J, Schiavo G et al (2013) Alternative fates of newly formed PrPSc upon prion conversion on the plasma membrane. *J Cell Sci* 126:3552–3562
78. Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 267:16188–16199
79. Magalhaes AC, Baron GS, Lee KS, Steele-Mortimer O, Dorward D et al (2005) Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J Neurosci* 25:5207–5216
80. Moya KL, Hassig R, Creminon C, Laffont I, Di Giamberardino L (2004) Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrPc in peripheral nerve. *J Neurochem* 88:155–160
81. Kratzel C, Kruger D, Beekes M (2007) Prion propagation in a nerve conduit model containing segments devoid of axons. *J Gen Virol* 88:3479–3485
82. Kunzi V, Glatzel M, Nakano MY, Greber UF, Van Leuven F et al (2002) Unhindered prion neuroinvasion despite impaired fast axonal transport in transgenic mice overexpressing four-repeat tau. *J Neurosci* 22:7471–7477
83. Shearin H, Bessen RA (2014) Axonal and transsynaptic spread of prions. *J Virol* 88:8640–8655
84. Langevin C, Andreoletti O, Le Dur A, Laude H, Beringue V (2003) Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 41:219–225
85. Casaccia-Bonnel P, Kascsak RJ, Fersko R, Callahan S, Carp RI (1993) Brain regional distribution of prion protein PrP27–30 in mice stereotaxically microinjected with different strains of scrapie. *J Infect Dis* 167:7–12
86. Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S et al (2011) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302:871–874
87. Raebler AJ, Race RE, Brandner S, Priola SA, Sailer A et al (1997) Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *EMBO J* 16:6057–6065
88. Guirouy DC, Wakayama I, Liberski PP, Gajdusek DC (1994) Relationship of microglia and scrapie amyloid-immunoreactive plaques in kuru, Creutzfeldt–Jakob disease and Gerstmann–Straussler syndrome. *Acta Neuropathol* 87:526–530
89. Aguzzi A, Zhu C (2017) Microglia in prion diseases. *J Clin Invest* 127:3230–3239
90. Alleaume-Butaux A, Nicot S, Pietri M, Baudry A, Dakowski C et al (2015) Double-edge sword of sustained ROCK activation in prion diseases through neuritegenesis defects and prion accumulation. *PLoS Pathog* 11:e1005073
91. Peyrin JM, Deleglise B, Saias L, Vignes M, Gougis P et al (2011) Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab Chip* 11:3663–3673
92. Dhainaut M, Moser M (2014) Regulation of immune reactivity by intercellular transfer. *Front Immunol* 5:112
93. Schatzl HM, Laszlo L, Holtzman DM, Tatzelt J, DeArmond SJ et al (1997) A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol* 71:8821–8831
94. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W et al (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9683–9688
95. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101:942–948

96. **Alais S, Simoes S, Baas D, Lehmann S, Raposo G et al (2008)** Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell* 100:603–615
97. Coleman BM, Hanssen E, Lawson VA, Hill AF (2012) Prion-infected cells regulate the release of exosomes with distinct ultrastructural features. *FASEB J* 26:4160–4173
98. **Leblanc P, Alais S, Porto-Carreiro I, Lehmann S, Grassi J et al (2006)** Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *EMBO J* 25:2674–2685
99. **Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R et al (2007)** Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* 211:582–590
100. Diedrich JF, Bendheim PE, Kim YS, Carp RI, Haase AT (1991) Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:375–379
101. **Hajj GN, Arantes CP, Dias MV, Roffe M, Costa-Silva B et al (2013)** The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 70:3211–3227
102. Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE (2007) Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev Neurobiol* 67:1815–1829
103. Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C et al (2006) **Exosomes are released by cultured cortical neurones.** *Mol Cell Neurosci* 31:642–648
104. Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A et al (2011) **Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity.** *Mol Cell Neurosci* 46:409–418
105. Victoria GS, Arkhipenko A, Zhu S, Syan S, Zurzolo C (2016) Astrocyte-to-neuron intercellular prion transfer is mediated by cell-cell contact. *Sci Rep* 6:20762
106. Raab-Traub N, Dittmer DP (2017) Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. *Nat Rev Microbiol* 15:559–572
107. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10592–10597
108. Hessvik NP, Llorente A (2018) Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 75:193–208
109. Kowal J, Tkach M, Thery C (2014) Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 29:116–125
110. **Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J et al (2013)** Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126:5553–5565
111. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A (2009) Multi-vesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* 10:925–937
112. **Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D et al (2008)** Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319:1244–1247
113. Boker KO, Lemus-Diaz N, Rinaldi Ferreira R, Schiller L, Schneider S et al (2018) **The impact of the CD9 tetraspanin on lentivirus infectivity and exosome secretion.** *Mol Ther* 26:634–647
114. **van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L et al (2011)** The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 21:708–721
115. Fader CM, Colombo MI (2009) Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* 16:70–78
116. Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerod L et al (2007) **Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease.** *J Cell Biol* 179:485–500
117. Oshima R, Hasegawa T, Tamai K, Sugeno N, Yoshida S et al (2016) **ESCRT-0 dysfunction compromises autophagic degradation of protein aggregates and facilitates ER stress-mediated neurodegeneration via apoptotic and necroptotic pathways.** *Sci Rep* 6:24997
118. Heiseke A, Aguib Y, Riemer C, Baier M, Schatzl HM (2009) Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy. *J Neurochem* 109:25–34
119. **Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Fuse T, Sano K et al (2015)** Strain-dependent effect of macroautophagy on abnormally folded prion protein degradation in infected neuronal cells. *PLoS One* 10:e0137958
120. Arellano-Anaya ZE, Huor A, Leblanc P, Lehmann S, Provansal M et al (2015) **Prion strains are differentially released through the exosomal pathway.** *Cell Mol Life Sci* 72:1185–1196
121. **Laferriere F, Tixador P, Moudjou M, Chapuis J, Sibille P et al (2013)** Quaternary structure of pathological prion protein as a determining factor of strain-specific prion replication dynamics. *PLoS Pathog* 9:e1003702
122. **Fang Y, Wu N, Gan X, Yan W, Morrell JC et al (2007)** Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol* 5:e158
123. Vidal M, Mangeat P, Hoekstra D (1997) Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci* 110(Pt 16):1867–1877
124. Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF (2012) Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 40:10937–10949
125. Guo BB, Bellingham SA, Hill AF (2015) The neutral sphingomyelinase pathway regulates packaging of the prion protein into exosomes. *J Biol Chem* 290:3455–3467
126. Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI (2003) Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* 278:20083–20090
127. Guo BB, Bellingham SA, Hill AF (2016) Stimulating the release of exosomes increases the intercellular transfer of prions. *J Biol Chem* 291:5128–5137
128. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Thery C (2012) Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18397>
129. **Zabeo D, Cvjetkovic A, Lasser C, Schorb M, Lotvall J et al (2017)** Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology. *J Extracell Vesicles* 6:1329476
130. Edgar JR, Eden ER, Futter CE (2014) Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. *Traffic* 15:197–211
131. **Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE et al (2006)** Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 172:923–935
132. **Mattei V, Barenco MG, Tasciotti V, Garofalo T, Longo A et al (2009)** Paracrine diffusion of PrP(C) and propagation of prion infectivity by plasma membrane-derived microvesicles. *PLoS One* 4:e5057
133. Krasemann S, Neumann M, Luepke JP, Grashorn J, Wurr S et al (2012) **Persistent retroviral infection with MoMuLV influences neuropathological signature and phenotype of prion disease.** *Acta Neuropathol* 124:111–126
134. **Leblanc P, Hasenkrug K, Ward A, Myers L, Messer RJ et al (2012)** Co-infection with the friend retrovirus and mouse scrapie does not alter prion disease pathogenesis in susceptible mice. *PLoS One* 7:e30872

135. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303:1007–1010
136. Austefjord MW, Gerdes HH, Wang X (2014) Tunneling nanotubes: diversity in morphology and structure. *Commun Integr Biol* 7:e27934
137. Sisakhtnezhad S, Khosravi L (2015) Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol* 94:429–443
138. Gerdes HH, Carvalho RN (2008) Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol* 20:470–475
139. Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, Purbhoo MA, Sowinski S et al (2006) Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 177:8476–8483
140. Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A et al (2008) Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 10:211–219
141. Eugenin EA, Gaskill PJ, Berman JW (2009) Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell Immunol* 254:142–148
142. Favoreel HW, Van Minnebruggen G, Adriaensen D, Nauwynck HJ (2005) Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8990–8995
143. Kumar A, Kim JH, Ranjan P, Metcalfe MG, Cao W et al (2017) Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread. *Sci Rep* 7:40360
144. Guo R, Katz BB, Tomich JM, Gallagher T, Fang Y (2016) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus utilizes nanotubes for intercellular spread. *J Virol* 90:5163–5175
145. Gousset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A et al (2009) Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 11:328–336
146. Watkins SC, Salter RD (2005) Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubes. *Immunity* 23:309–318
147. Chinnery HR, Pearlman E, McMenamin PG (2008) Cutting edge: membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class I⁺ cells in the mouse cornea. *J Immunol* 180:5779–5783
148. Huang FP, Farquhar CF, Mabbott NA, Bruce ME, MacPherson GG (2002) Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol* 83:267–271
149. Zhu S, Victoria GS, Marzo L, Ghosh R, Zurzolo C (2015) Prion aggregates transfer through tunneling nanotubes in endocytic vesicles. *Prion* 9:125–135
150. Rouvinski A, Karniely S, Kounin M, Moussa S, Goldberg MD et al (2014) Live imaging of prions reveals nascent PrP^{Sc} in cell-surface, raft-associated amyloid strings and webs. *J Cell Biol* 204:423–441
151. Baron GS, Magalhaes AC, Prado MA, Caughey B (2006) Mouse-adapted scrapie infection of SN56 cells: greater efficiency with microsome-associated versus purified PrP-res. *J Virol* 80:2106–2117
152. Victoria GS, Zurzolo C (2017) The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: implications for neurodegenerative diseases. *J Cell Biol* 216:2633–2644
153. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Gonzalez E, Berisa A, Gil D et al (2010) Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. *Proteom Clin Appl* 4:416–425
154. Robertson C, Booth SA, Beniac DR, Coulthart MB, Booth TF et al (2006) Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* 107:3907–3911
155. Berrone E, Corona C, Mazza M, Vallino Costassa E, Faro ML et al (2015) Detection of cellular prion protein in exosomes derived from ovine plasma. *J Gen Virol* 96:3698–3702
156. Ritchie AJ, Crawford DM, Ferguson DJ, Burthem J, Roberts DJ (2013) Normal prion protein is expressed on exosomes isolated from human plasma. *Br J Haematol* 163:678–680
157. Vella LJ, Greenwood DL, Cappai R, Scheerlinck JP, Hill AF (2008) Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet Immunol Immunopathol* 124:385–393
158. van Herwijnen MJ, Zonneveld MI, Goerdal S, Nolte-t Hoen EN, Garssen J et al (2016) Comprehensive proteomic analysis of human milk-derived extracellular vesicles unveils a novel functional proteome distinct from other milk components. *Mol Cell Proteom* 15:3412–3423
159. Gough KC, Maddison BC (2010) Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion* 4:275–282
160. Turner ML, Ludlam CA (2009) An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt–Jakob disease by blood and plasma products. *Br J Haematol* 144:14–23
161. Lacroux C, Simon S, Benestad SL, Maillet S, Mathey J et al (2008) Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog* 4:e1000238
162. Franceschini A, Baiardi S, Hughson AG, McKenzie N, Moda F et al (2017) High diagnostic value of second generation CSF RT-QuIC across the wide spectrum of CJD prions. *Sci Rep* 7:10655
163. Brown P, Gibbs CJ Jr, Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP et al (1994) Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol* 35:513–529
164. Cervenkova L, Saa P, Yakovleva O, Vasilyeva I, de Castro J et al (2016) Are prions transported by plasma exosomes? *Transfus Apher Sci* 55:70–83
165. Saa P, Yakovleva O, de Castro J, Vasilyeva I, De Paoli SH et al (2014) First demonstration of transmissible spongiform encephalopathy-associated prion protein (PrP^{TSE}) in extracellular vesicles from plasma of mice infected with mouse-adapted variant Creutzfeldt–Jakob disease by in vitro amplification. *J Biol Chem* 289:29247–29260
166. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C et al (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>
167. Properzi F, Logozzi M, Abdel-Haq H, Federici C, Lugini L et al (2015) Detection of exosomal prions in blood by immunofluorescence techniques. *J Gen Virol* 96:1969–1974
168. Mustapic M, Eitan E, Werner JK Jr, Berkowitz ST, Lazaropoulos MP et al (2017) Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: a potential window into brain pathologic processes. *Front Neurosci* 11:278
169. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S et al (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 29:341–345
170. Ridder K, Keller S, Dams M, Rupp AK, Schlaudraff J et al (2014) Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS Biol* 12:e1001874
171. Fruhbeis C, Frohlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S et al (2013) Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol* 11:e1001604
172. Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y et al (2016) Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature* 535:551–555

173. Lewis S (2013) Glia: transporting cargo from A to B. *Nat Rev Neurosci* 14:589
174. **Xin H, Katakowski M, Wang F, Qian JY, Liu XS et al (2017)** MicroRNA cluster miR-17-92 cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats. *Stroke* 48:747–753
175. Perez-Gonzalez R, Gauthier SA, Kumar A, Levy E (2012) The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. *J Biol Chem* 287:43108–43115
176. Gerdes HH, Rustom A, Wang X (2013) Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mech Dev* 130:381–387
177. Pyrgaki C, Trainor P, Hadjantonakis AK, Niswander L (2010) Dynamic imaging of mammalian neural tube closure. *Dev Biol* 344:941–947
178. Salas-Vidal E, Lomeli H (2004) Imaging filopodia dynamics in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 265:75–89
179. Lou E, Fujisawa S, Barlas A, Romin Y, Manova-Todorova K et al (2012) **Tunneling nanotubes: a new paradigm for studying intercellular communication and therapeutics in cancer.** *Commun Integr Biol* 5:399–403
180. **Lou E, Fujisawa S, Morozov A, Barlas A, Romin Y et al (2012)** Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *PLoS One* 7:e33093
181. Beekes M, Thomzig A, Schulz-Schaeffer WJ, Burger R (2014) Is there a risk of prion-like disease transmission by Alzheimer- or Parkinson-associated protein particles? *Acta Neuropathol* 128:463–476
182. Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VM, Trojanowski JQ (2015) Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci* 16:109–120
183. Jucker M, Walker LC (2013) Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501:45–51
184. **Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P et al (2012)** Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338:949–953
185. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimozawa A et al (2014) **Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks.** *Acta Neuropathol Commun* 2:88
186. **Ayers JI, Fromholt S, Koch M, DeBosier A, McMahon B et al (2014)** Experimental transmissibility of mutant SOD1 motor neuron disease. *Acta Neuropathol* 128:791–803
187. Munch C, O'Brien J, Bertolotti A (2011) Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:3548–3553
188. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H et al (2013) **Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains.** *Cell Rep* 4:124–134
189. Nomura T, Watanabe S, Kaneko K, Yamanaka K, Nukina N et al (2014) **Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis.** *J Biol Chem* 289:1192–1202
190. **Sun Z, Diaz Z, Fang X, Hart MP, Chesni A et al (2011)** Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS. *PLoS Biol* 9:e1000614
191. Chang YJ, Jeng US, Chiang YL, Hwang IS, Chen YR (2016) The glycine-alanine dipeptide repeat from C9orf72 hexanucleotide expansions forms toxic amyloids possessing cell-to-cell transmission properties. *J Biol Chem* 291:4903–4911
192. **Zhou Q, Lehmer C, Michaelsen M, Mori K, Alterauge D et al (2017)** Antibodies inhibit transmission and aggregation of C9orf72 poly-GA dipeptide repeat proteins. *EMBO Mol Med* 9:687–702
193. **Jeon I, Cicchetti F, Cisbani G, Lee S, Li E et al (2016)** Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein. *Acta Neuropathol* 132:577–592
194. **Tan Z, Dai W, van Erp TG, Overman J, Demuro A et al (2015)** Huntington's disease cerebrospinal fluid seeds aggregation of mutant huntingtin. *Mol Psychiatry* 20:1286–1293
195. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S et al (2009) **Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain.** *Nat Cell Biol* 11:909–913
196. Holmes BB, Diamond MI (2014) Prion-like properties of Tau protein: the importance of extracellular Tau as a therapeutic target. *J Biol Chem* 289:19855–19861
197. **Woerman AL, Aoyagi A, Patel S, Kazmi SA, Lobach I et al (2016)** Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy patients propagate in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E8187–E8196
198. Langer F, Eisele YS, Fritschi SK, Staufenbiel M, Walker LC et al (2011) **Soluble Abeta seeds are potent inducers of cerebral beta-amyloid deposition.** *J Neurosci* 31:14488–14495
199. Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C et al (2006) **Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host.** *Science* 313:1781–1784
200. Costanzo M, Zurzolo C (2013) The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration. *Biochem J* 452:1–17
201. **Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD et al (2006)** Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11172–11177
202. Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR et al (2012) **Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers.** *Mol Neurodegener* 7:42
203. **Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Kruger L, Irsen S et al (2017)** The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener* 12:5
204. **Grad LI, Yerbury JJ, Turner BJ, Guest WC, Pokrishevsky E et al (2014)** Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:3620–3625
205. Feiler MS, Strobel B, Freischmidt A, Helferich AM, Kappel J et al (2015) **TDP-43 is intercellularly transmitted across axon terminals.** *J Cell Biol* 211:897–911
206. **Kamelgarn M, Chen J, Kuang L, Arenas A, Zhai J et al (2016)** Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS. *Biochim Biophys Acta* 1862:2004–2014
207. **Westergard T, Jensen BK, Wen X, Cai J, Kropf E et al (2016)** Cell-to-cell transmission of dipeptide repeat proteins linked to C9orf72-ALS/FTD. *Cell Rep* 17:645–652
208. **Zhang X, Abels ER, Redzic JS, Margulis J, Finkbeiner S et al (2016)** Potential transfer of polyglutamine and CAG-repeat RNA in extracellular vesicles in Huntington's disease: background and evaluation in cell culture. *Cell Mol Neurobiol* 36:459–470
209. Howitt J, Hill AF (2016) Exosomes in the pathology of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 291:26589–26597
210. Walsh DM, Selkoe DJ (2016) A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 17:251–260
211. **Gutkunst CA, Levey AI, Heilman CJ, Whaley WL, Yi H et al (1995)** Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8710–8714
212. **Liot G, Zala D, Pla P, Mottet G, Piel M et al (2013)** Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *J Neurosci* 33:6298–6309