



Développement d'outils thérapeutiques ciblant les agrégats d'alpha-synucléine dans les synucléinopathies

Maud Landureau

► To cite this version:

Maud Landureau. Développement d'outils thérapeutiques ciblant les agrégats d'alpha-synucléine dans les synucléinopathies. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UP-ASL022 . tel-04010780

HAL Id: tel-04010780

<https://theses.hal.science/tel-04010780>

Submitted on 2 Mar 2023

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.

Développement d'outils thérapeutiques
ciblant les agrégats d'alpha-synucléine
dans les synucléinopathies
*Therapeutic tools targeting alpha-synuclein assemblies
propagation in synucleinopathies*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale : École doctorale n° 568 : signalisations et réseaux intégratifs en biologie,
(Biosigne)

Spécialité du doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Laboratoire des Maladies

Neurodégénératives : mécanismes, thérapies, imagerie, 92265, Fontenay-aux-Roses, France

Référent : Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 18/03/2021 par
Maud LANDUREAU

Composition du Jury

Michael SCHUMACHER

Directeur de Recherche INSERM,
université Paris Saclay

Président du jury

Marie-Claude POTIER

Directrice de Recherche CNRS, ICM

Rapporteur

Sarah CIANFERANI

Directrice de Recherche CNRS, IPHC

Rapporteur

Stéphane HUNOT

Directeur de Recherche CNRS, ICM

Examineur

Direction de la thèse

Ronald MELKI

Directeur de Recherche CNRS, CEA de
Fontenay-aux-Roses

Directeur de thèse

Stéphanie EYQUEM

Sanofi

Co-encadrante

Virginie REDEKER

Directrice de Recherche INSERM, CEA
de Fontenay-aux-Roses

Co-encadrante

Titre : Développement d'outils thérapeutiques ciblant la propagation des agrégats d'alpha-synucléine dans les synucléinopathies

Mots clés : alpha-synucléine, synucléinopathies, souches, cartographie de surface

Résumé : L'agrégation d'alpha-synucléine et la propagation de ces agrégats de neurone à neurone ont, de manière récurrente, été montrées comme étant au cœur du processus physiopathologique de différentes maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, les démences à corps de Lewy ou les atrophies multisystématisées. Bien que ces synucléinopathies aient en commun la présence de dépôts fibrillaires riches en alpha-synucléine, les phénotypes pathologiques sont différents. Notre hypothèse est que la présence de différentes "souches" d'alpha-synucléine fibrillaires présentant différentes affinités, tropismes, propriétés d'internalisation et de propagation pourrait expliquer l'hétérogénéité physiopathologique et clinique retrouvée dans la maladie de Parkinson et les autres synucléinopathies. Le but de ce projet était de déterminer comment interférer avec la liaison et la propagation "prion-like" de ces assemblages d'alpha-synucléine dans les neurones. Dans cet objectif, nous avons caractérisé les surfaces de trois souches d'alpha-synucléine. Dans un premier temps, nous avons mis en place des approches *in vitro* de protéolyses ménagées et de marquages hydrogène-deutérium combinées à la spectrométrie de masse qui nous ont permis de cartographier la surface d'agrégats fibrillaires d'alpha-synucléine générés *in vitro*. Dans un second temps, nous avons étudié la prise en charge de différentes souches d'alpha-synucléine par des cultures primaires de neurones ou d'astrocytes afin d'analyser les caractéristiques de dégradation des souches *in cellulo*, liées à leurs spécificités de surface déterminées préalablement. La cartographie réalisée ouvre la voie, à long terme, au développement d'outils diagnostics ou thérapeutiques hautement spécifiques capables de reconnaître spécifiquement différentes souches d'alpha-synucléine ou d'inhiber la propagation de cellule à cellule de ces agrégats afin de ralentir ou d'arrêter la progression de la maladie.

Title : Therapeutic tools targeting alpha-synuclein assemblies propagation in synucleinopathies

Keywords : alpha-synuclein, synucleinopathies, strains, surface mapping

Abstract: The aggregation of alpha-synuclein and the spread of aggregates from neuron to neuron have been consistently shown to be at the heart of the pathophysiological process of devastating neurodegenerative diseases like Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies or multiple system atrophy. While fibrillar alpha-synuclein rich deposits are a common hallmark of synucleinopathies, distinct pathological phenotypes are observed. We hypothesize that different "strains" of fibrillar alpha-synuclein with different affinity/tropism, internalization and seeding properties, may account for the patho-physiological and clinical heterogeneity in Parkinson's disease and other synucleinopathies. We aim to determine a way to interfere with the binding to neurons of distinct alpha-synuclein assemblies and their prion-like propagation. To this end, we mapped the surface of three distinct alpha-synuclein strains. First, we implemented limited proteolysis and hydrogen-deuterium approaches combined to mass spectrometry in order to map, *in vitro*, the solvent exposed-surfaces of fibrillar alpha-synuclein assemblies generated *in vitro*. Second, we studied the processing of different alpha-synuclein strains using primary cultures of neurons and astrocytes in order to analyze the strain degradation characteristics *in cellulo*, related to the surface specificities determined *in vitro*. Mapping the surfaces of those assemblies and identification of exposed and protected strain-specific sequences open the way, in the long term, for developing highly specific binders that might either detect specific alpha-synuclein strains or inhibit cell-to-cell propagation disease progression.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

REMERCIEMENTS

« En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche. » J. Rouxel

Je souhaite tout d'abord remercier Marie-Claude Potier et Stéphane Hunot d'avoir suivi l'évolution de ce travail pendant ces trois dernières années et d'avoir accepté de lire et de juger cette thèse. Je remercie également vivement Sarah Sanglier-Cianferani et Michael Schumacher d'avoir également accepté de lire et de juger mon travail de thèse.

Je remercie Ronald Melki de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir encadrée durant ma thèse. Je le remercie pour ses conseils durant ces trois années et pour toutes les corrections qu'il a apportées à ce manuscrit.

Je remercie Stéphanie Eyquem qui m'a permis d'effectuer cette thèse et qui a suivi l'ensemble de mon travail.

Je remercie énormément Virginie Redeker, de m'avoir formée sur les techniques de spectrométrie de masse et de m'avoir très largement encadrée, en particulier pendant cette dernière année.

Je remercie Luc Bousset pour ses conseils et sa sympathie. Je le remercie également d'avoir effectué l'ensemble des images de microscopie électronique présentes dans ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement Laïla de m'avoir formée à l'utilisation du MALDI-TOF et Audrey de m'avoir formée à mon arrivée au laboratoire.

Je remercie évidemment l'ensemble des personnes de l'équipe et de MIRCen avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Je remercie tout particulièrement Emilie, pour avoir toujours été là pour me remonter le moral en toute situation. Je remercie bien sûr Maya, pour nos séances d'escalade, pour sa gentillesse, et pour son soutien constant. Je remercie Nolwen, pour avoir corrigé ce manuscrit et pour le bonheur que c'est de travailler avec elle. Je remercie évidemment Alexis, pour avoir partagé son bureau avec moi pendant trois ans, et pour toute l'aide qu'il a pu m'apporter. Je remercie énormément Tracy, pour ce qu'elle fait pour cette équipe, pour être toujours là pour me dépanner quand je n'ai plus de voiture, et pour son sourire quotidien. Je remercie Karine pour toute l'aide qu'elle m'a apportée. Je remercie bien sûr tous les autres membres présents et passés de l'équipe qui m'ont soutenue et aidée durant cette thèse.

Je remercie ma famille, en particulier mes parents et ma sœur, qui m'ont toujours poussée, soutenue et encouragée dans toutes mes aventures et qui sont toujours présents pour moi en toute situation.

Je remercie Pierre-Louis, d'avoir été près de moi tous les jours ces dernières années, dans les bons moments comme dans les plus difficiles.

Je remercie Charlène, d'être un pilier dans ma vie et de m'aider à grandir et à me construire depuis plus 15 ans.

Je remercie mes amis, pour leur présence et pour tous les moments passés et à venir avec eux. Je remercie tout particulièrement Lou-Anne, Margaux, Charlotte R., Alex, Donatien, Kenne, Clovis, Benji, Antoine, Arthur, Clément, David, Marc, Gauthier. Je remercie également les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer ici, en particulier Eva et Nadège.

Table des matières

PREAMBULE	11
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	14
1. Maladie de Parkinson et synucléinopathies.....	14
a. La maladie de Parkinson.....	14
b. Les autres synucléinopathies	20
c. Méthodes de diagnostic.....	23
d. Les traitements actuels	26
e. Les traitements expérimentaux	31
2. L'alpha-synucléine physiologique et pathologique.....	34
a. Rôle et structure physiologique	34
b. Dégradation.....	38
c. Agrégation pathologique.....	41
d. Propagation	44
a. Les maladies à Prions	46
e. Formes modifiées	49
3. Synucléinopathies et mécanisme « prion-like ».....	51
b. Caractéristiques communes entre l'alpha-synucléine et la protéine PrP.....	51
c. Notion de souches du Prion	52
d. Les souches d'alpha-synucléine	55
e. Elucidation des structures de l'alpha-synucléine en condition pathologique	59
4. Objectifs de l'étude	65
CHAPITRE 2 : METHODOLOGIES ET OPTIMISATIONS.....	68
1. Contrôle de l'assemblage des souches d'alpha-synucléine	68
a. Méthodes d'assemblage	68
b. Méthodes de caractérisation	70
2. Cartographie des surfaces accessibles des souches d'alpha-synucléine	73
a. Cartographie des surfaces par protéolyse ménagée	73
b. Cartographie des surfaces par échanges hydrogène-deutérium.....	84
c. Discrimination des souches par accessibilité des anticorps	94
3. Etude de la clairance des souches in cellulo	94
CHAPITRE 3: RESULTATS	99

1.	Cartographie de la surface de souches d'alpha-synucléine	99
2.	Etude du processing de souches d'alpha-synucléine par les astrocytes et les neurones.....	124
CHAPITRE 4 : CONCLUSION ET DISCUSSION		144
1.	Etude de la surface de souches d'alpha-synucléine <i>in vitro</i>	144
2.	Etude de la surface des souches <i>in cellulo</i>	146
3.	Conséquences fonctionnelles des spécificités de surface	147
4.	Perspectives.....	149
REFERENCES		154

Table des figures

Figure 1 : Morphologie des corps de Lewy.....	17
Figure 2: Les stades de Braak.....	18
Figure 3: Caractéristiques des synucléinopathies	22
Figure 4: Système dopaminergique	27
Figure 5: Organisation primaire de l'alpha-synucléine	36
Figure 6: Agrégation de l'alpha-synucléine.....	43
Figure 7: Propagation de l'alpha-synucléine.....	49
Figure 8: Durée d'incubation de deux souches de l'agent prion.....	53
Figure 9: Profils protéolytiques d'agrégats de PrP-sc issus de patients.....	54
Figure 10: Caractérisation de deux souches d'alpha-synucléine	56
Figure 11: Structure secondaire de trois souches d'alpha-synucléine	60
Figure 12: Organisation spatiale des fibres d'alpha-synucléine	62
Figure 13: Structures de différents polymorphes d'alpha-synucléine	64
Figure 14 : Purification et agrégation de l'alpha-synucléine.....	70
Figure 15 : Microscopie électronique.....	71
Figure 16: La protéolyse ménagée	72
Figure 17 : Profils protéolytiques.....	73
Figure 18: Sites de coupure préférentiels des enzymes	75
Figure 19 : Mises au point de la protéolyse ménagée par la thermolysine.....	76
Figure 20 : Comparaison des profils protéolytiques des souches digérées par la thermolysine et l'élastase.	77
Figure 21 : Identification des peptides protéolytiques par immuno-marquage.....	79
Figure 21 : Principe de l'analyseur de type TOF en mode linéaire ou réflecteur.	81
Figure 22 : Solubilisation des souches protéolysées par la thermolysine.....	82
Figure 23 : Analyse MS des fragments protéolytiques.....	84

Figure 24 : Hydrogènes analysables par HDX et influence de la température et du pH.....	86
Figure 25: Les échanges hydrogène-deutérium.....	87
Figure 26: Optimisation de la digestion des souches d'alpha-synucléine par la pepsine	89
Figure 27: Recouvrement de séquence	91
Figure 28: Cinétique des échanges hydrogène-deutérium du peptide 39-54.....	93
Figure 29 : Morphologie des neurones et des astrocytes à DIV13	96
Figure 30: Etude de l'internalisation et de la dégradation de l'alpha-synucléine par les astrocytes ou les neurones	98

Abréviations

AMS: Atrophie multi-systématisée

D₂O: Deuterium

DLB: Démences à corps de Lewy

EDTA: Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

HCCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

HDX-MS: Hydrogen Deuterium Exchange – mass spectrometry (échanges hydrogène-deuterium couplés à la spectrométrie de masse)

HFIP: Hexa Fluoro Iso Propanol

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-Of-Flight

MET: Microscopie Electronique à Transmission

NAC: Non Amyloid- β Component

PMSF: Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

PPM : Partie Par Million

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TFA: Trifluoroacetic acid

PREAMBULE

Les synucléinopathies correspondent à un groupe de maladies neurodégénératives regroupant notamment la maladie de Parkinson, les démences à corps de Lewy et l'atrophie multi-systématisée. Les patients atteints présentent un repliement anormal et des formes agrégées de l'alpha-synucléine, une petite protéine endogène majoritairement neuronale (*Spillantini et al., 1998*). Un grand nombre d'études suggèrent que cette protéine anormalement conformée est capable de s'agréger et de se propager dans le cerveau à la manière d'un Prion (*Volpicelli et Brundin, 2018*).

Notre hypothèse est que la structure des agrégats d'alpha-synucléine présents dans le cerveau des patients atteints de synucléinopathies conditionne la pathologie engendrée. En effet, il a été démontré, à la fois *in vitro* et chez des patients atteints de synucléinopathies, que l'alpha-synucléine peut s'assembler selon plusieurs types de fibres ou "souches" présentant des structures différentes (*Bousset et al., 2013, Spillantini et al., 1998, Peng et al., 2018, Shahnawaz et al., 2020, Van der Perren et al., 2020*). *In cellulo* et *in vivo*, les différences de structure des souches entraînent des caractéristiques fonctionnelles uniques (*Shrivastava et al., 2020, Peelaerts et al., 2015*). Dans le cerveau des patients, les différences de la surface des souches pourraient également entraîner des différences en termes de liaison aux protéines et lipides environnants. Dans ce cas, chaque souche aurait des propriétés d'internalisation, de propagation et de toxicité uniques entraînant des pathologies distinctes.

L'objectif de cette thèse est de décrire les surfaces de trois souches d'alpha-synucléine générées *in vitro* puis d'analyser leur accessibilité au solvant *in vitro* et *in cellulo* ainsi que certaines caractéristiques fonctionnelles.

L'utilisation de protéines recombinantes permet d'avoir accès à une quantité importante de matériel. J'ai ainsi pu faire agréger *in vitro* de l'alpha-synucléine selon trois souches différentes que j'ai caractérisées. Afin de décrire la surface des souches, j'ai effectué des expériences de protéolyses ménagées en utilisant différentes enzymes. En identifiant les peptides générés grâce à plusieurs anticorps monoclonaux puis par spectrométrie de masse j'ai défini des régions

accessibles au solvant et des régions protégées. J'ai confirmé et précisé ces résultats grâce à des expériences d'échanges hydrogène-deutérium couplées à la spectrométrie de masse puis par des expériences d'accessibilité des souches à des anticorps monoclonaux.

Dans un second temps, j'ai généré des cultures primaires d'astrocytes et de neurones que j'ai exposées à ces mêmes souches d'alpha-synucléine. J'ai ensuite analysé par immunomarquage l'internalisation et la dégradation de ces souches à différents temps ainsi que les formes tronquées de l'alpha-synucléine générées par les cellules.

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* montrent des différences d'accessibilité importantes entre les trois souches au niveau de la région N-terminale de la protéine. Les extrémités C-terminales sont, quant à elles, fortement accessibles pour chacune des souches étudiées.

L'accessibilité de l'extrémité C-terminale des trois souches est confirmée *in cellulo*. En effet, les astrocytes et les neurones génèrent des formes tronquées en C-terminale de l'alpha-synucléine après avoir été exposés à ces souches témoignant de l'accessibilité de cette région. J'ai également pu identifier des caractéristiques fonctionnelles dépendantes de la souche d'alpha-synucléine. En particulier, la souche « ruban » est internalisée de manière plus importante par les cellules et la souche « fibres 91 » est dégradée plus efficacement que les autres souches à court terme par les neurones et les astrocytes. De manière intéressante, j'ai également mis en évidence un rôle prépondérant des astrocytes dans la dégradation des différentes souches d'alpha-synucléine étudiées.

Le dernier chapitre de cette thèse replace l'ensemble de nos conclusions dans le contexte bibliographique pré-existant et ouvre des perspectives nouvelles pour lutter contre les synucléinopathies. En effet, il a été récemment montré que les souches d'alpha-synucléine assemblées *in vitro* par notre équipe présentent des surfaces proches de celles des agrégats issus de patients atteints de synucléinopathies (Van der Perren *et al.*, 2020). La cartographie des surfaces des souches pourrait donc, à plus long terme, servir à développer des outils de diagnostics et/ou de cibles thérapeutiques spécifiques. Les résultats obtenus confirment également que les différences de structure des agrégats d'alpha-synucléine entraînent des caractéristiques fonctionnelles uniques qui expliquent en partie l'hétérogénéité des synucléinopathies. Enfin, le rôle des astrocytes dans la dégradation des agrégats d'alpha-

synucléine, récemment décrit par d'autres études (*Filippini et al., 2020, Tsunemi et al., 2020*) pourrait représenter une nouvelle piste thérapeutique d'intérêt.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Dans ce chapitre, nous allons introduire les différents concepts et études qui ont mené à la mise en place de ce projet de thèse. Nous commencerons par décrire les différentes synucléinopathies. Nous nous intéresserons ensuite à l'alpha-synucléine, protéine impliquée dans ces pathologies. Enfin, nous verrons en quoi les synucléinopathies ont des mécanismes d'action proches de ceux des maladies à Prion. Nous nous intéresserons tout particulièrement au phénomène de souche permettant de relier différentes structures d'agrégats d'une même protéine à différentes pathologies.

1. Maladie de Parkinson et synucléinopathies

Les synucléinopathies correspondent à un groupe de maladies neurodégénératives regroupant notamment la maladie de Parkinson, les démences à corps de Lewy et l'atrophie multi-systématisée. La caractéristique moléculaire commune de ces pathologies est la présence pathologique d'agrégats protéiques et lipidiques dans le cerveau des patients. Ces agrégats sont en partie composés d'une protéine endogène anormalement repliée et sous forme fibrillaire, l'alpha-synucléine (*Spillantini et al., 1998, Wakabayashi et al., 1998*). Il y a encore aujourd'hui un débat pour savoir si ces maladies sont réellement des pathologies distinctes ou bien si elles correspondent aux extrémités du spectre d'une même maladie. Cela est tout particulièrement vrai dans le cas de la maladie de Parkinson et de la démence à corps de Lewy. Afin de simplifier notre message, nous allons ici les considérer comme des pathologies distinctes tout en gardant en tête que les frontières entre chacune de ces maladies ne sont pas toujours aussi claires que leurs définitions. Nous commencerons par décrire ces différentes pathologies ainsi que les traitements actuellement utilisés et expérimentaux.

a. La maladie de Parkinson

Découverte de la maladie de Parkinson

C'est en 1817, dans son Essai sur la Paralysie Tremblante (*An Essay on the Shaking Palsy*) que James Parkinson décrit pour la première fois avec précision des cas cliniques de patients atteints de la maladie qui sera appelée plus tard « maladie de Parkinson » par le neurobiologiste français

Jean-Martin Charcot. Il évoque des patients présentant une rigidité musculaire associée à des tremblements involontaires de repos. L'idée d'une évolution lente et progressive de cette pathologie est également très présente. Il décrit comme première étape de la maladie « un petit sentiment de faiblesse avec une propension au tremblement par une partie du corps, souvent une main ou un bras ». Avec le temps, la posture du patient se modifie, les gestes du quotidien nécessitent de plus en plus d'efforts, les tremblements deviennent omniprésents jusqu'à ce que le patient ne puisse même plus marcher et montre des signes de démence (*Parkinson, 1817*).

Depuis, la liste des symptômes de cette maladie s'est précisée. Les symptômes moteurs sont : des tremblements de repos, une rigidité musculaire, une akinésie ou bradykinésie (difficulté dans l'initiation des mouvements, lenteur et perte des mouvements fins). Au moins deux de ces trois symptômes doivent être présents afin de diagnostiquer une maladie de Parkinson. Une instabilité posturale est également régulièrement observée. Plusieurs symptômes non moteurs comme une fatigue intense, des perturbations du sommeil, une anosmie (perte de l'odorat), de la constipation, des problèmes intestinaux, des anomalies du système autonome, des anomalies comportementales, de l'anxiété, des hallucinations et parfois de la démence ont également été décrits (*Jankovic, 2008*). Certains de ces symptômes (constipation, anosmie ou micrographie) apparaissent d'ailleurs souvent plusieurs années avant les symptômes moteurs mais sont beaucoup trop peu spécifiques pour permettre de poser un diagnostic.

Les symptômes moteurs sont majoritairement dus à une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* au cours de la pathologie. Cette région perd d'ailleurs sa coloration noire dû à la neuromélanine présente dans les cellules qui la composent (*Hirsch et al., 1988*). Cette dégénérescence entraîne chez le patient un déficit en dopamine, neurotransmetteur impliqué dans le contrôle des mouvements ainsi que dans la motivation.

Les corps de Lewy et l'alpha-synucléine

Cent ans après la description par J. Parkinson de cette maladie, Frederic Lewy découvre dans le cerveau de patients, des dépôts anormaux que l'on nommera des corps de Lewy (*Lewy, 1912*).

Ces corps de Lewy sont classiquement définis comme des inclusions protéiques sphériques éosinophiles cytoplasmiques intra-neurales. Ces inclusions sont denses, avec une largeur d'une dizaine de nanomètres et présentent un halo. Ce type de corps de Lewy très caractéristique est dit « classique » ou corps de Lewy du tronc cérébral. D'autres corps de Lewy dits « corticaux » montrent une forme plus irrégulière et ne présentent en général pas de halo. Il a également été observé des neurites de Lewy correspondant à des filaments similaires à ceux

qui composent les corps de Lewy mais localisés dans les axones ou les dendrites des neurones (Figure 1).

La composition moléculaire de ces inclusions resta longtemps mystérieuse. Plusieurs dizaines d'années après la découverte de F. Lewy, il est mis en évidence qu'une mutation ou des duplications/triplications du gène *SNCA* codant pour l'alpha-synucléine est responsable de certaines formes génétiques de maladie de Parkinson (*Polymeropoulos et al., 1997*). Dans le même temps, il est montré que de l'alpha-synucléine agrégée est présente dans les corps de Lewy et les neurites de Lewy retrouvés dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson et de démences à corps de Lewy (*Spillantini et al., 1998*). D'autres protéines, comme l'ubiquitine, avaient déjà été détectées dans ces corps de Lewy mais en quantité moindre (*Manetto et al., 1998*). L'alpha-synucléine apparaît donc comme la composante majoritaire des corps de Lewy. C'est à partir de ces découvertes que le lien entre l'alpha-synucléine et la maladie de Parkinson a commencé à être étudié plus intensément.

Notons cependant qu'aujourd'hui encore, la composition, le rôle et la définition même des corps de Lewy ne sont pas claires. En effet, ces corps de Lewy ne sont pas exclusivement composés d'alpha-synucléine, au moins 90 autres protéines ont pu être mises en évidence par immunohistochimie. Ces protéines sont majoritairement en lien avec les mitochondries, le système de dégradation ubiquitine-protéasome ou l'autophagie. Les corps de Lewy contiennent également des lipides, des structures vésiculaires et membranaires ou même des organelles (*Shahmoradian et al., 2019*).

En terme fonctionnel, ces corps de Lewy ont d'abord été présentés comme toxiques car présents dans les zones du cerveau qui dégénèrent. Cependant, une autre hypothèse propose qu'ils soient capables de séquestrer des molécules cytotoxiques (telles que les oligomères d'alpha-synucléine) et deviendraient alors protecteurs.

En termes de définition, comme nous l'avons dit précédemment, certains de ces corps de Lewy ne sont pas ronds et denses et certains ne sont même pas immuno-positifs pour l'alpha-synucléine. Une définition plus claire de ce que l'on considère aujourd'hui comme les caractéristiques essentielles d'un corps de Lewy semble donc nécessaire (*Wakabayashi et al., 2012*).

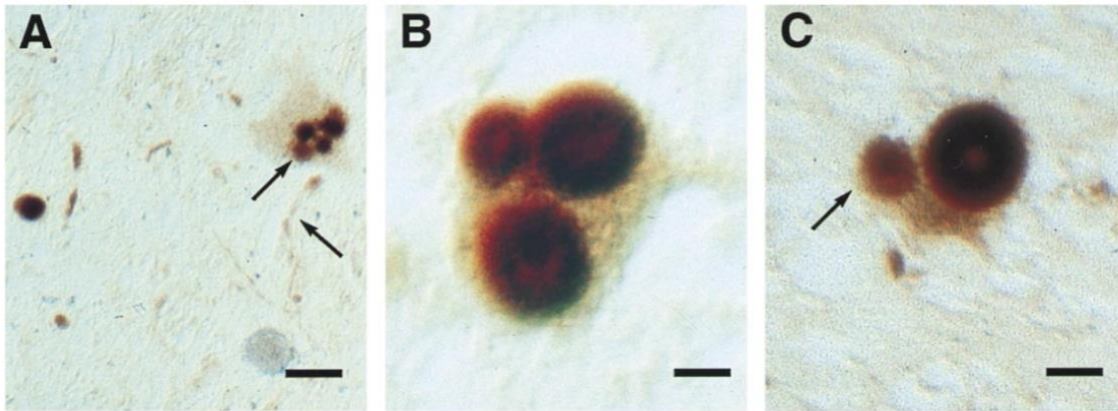


Figure 1 : Morphologie des corps de Lewy

Issue de Spillantini et al., 1998. Corps et neurites de Lewy présents dans les neurones de la substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson avec un immuno-marquage pour l'alpha-synucléine (en marron) et l'ubiquitine (en bleu). Bar d'échelle : 30um (A), 10um (B), 13um (C). Les flèches indiquent les corps ou neurites de Lewy présentant un marquage pour l'alpha-synucléine uniquement.

La découverte de ces inclusions a permis d'étudier l'évolution de la maladie au cours du temps d'un point de vue microscopique. De cette manière, l'équipe de Heiko Braak a pu démontrer que ces inclusions se propagent dans le cerveau des patients en suivant un schéma prévisible. Ce schéma est en accord avec l'apparition des symptômes de la maladie.

La théorie de Braak est qu'un agent pathogène neurotrophique, probablement viral, entre dans le cerveau par le nez ou l'estomac avant d'affecter le cerveau (*Hawkes et al., 2007*). Aucun agent pathogène ou virus n'a pu être trouvé. En revanche, les similitudes entre la maladie de Parkinson et les maladies à Prion suggèrent largement que l'alpha-synucléine agrégée, à la manière du Prion, soit cet agent infectieux non conventionnel (*Brudin et al., 2016*).

La maladie de Parkinson a ainsi été divisée en six stades de Braak comme représenté sur la figure 2. Selon ce schéma, la pathologie commencerait au niveau du tronc cérébral et/ou du bulbe olfactif expliquant ainsi les symptômes très précoces d'anosmie et de constipation. En suivant cette hypothèse, plusieurs équipes ont proposé que la pathologie puisse débuter au niveau de l'intestin (*Fenyl et al., 2019, Kim et al., 2019*). Des lésions pathologiques sont effectivement détectables au niveau intestinal de manière très précoce, parfois avant même que le diagnostic d'une maladie de Parkinson n'ait été établi (*Fenyl et al., 2019*). La pathologie se propagerait ensuite progressivement dans le locus coeruleus et ne toucherait la substance noire qu'à partir du stade 3. La dégénérescence de la substance noire est liée à l'apparition des symptômes

moteurs (*Braak et al., 2003*). Lors des stades 5 et 6, les régions corticales et limbiques seraient fortement affectées entraînant le déclin cognitif du patient.



Figure 2: Les stades de Braak

Modifiée de Braak et al., 2003, Evolution au cours du temps de la présence de corps de Lewy chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Abréviations: dm: dorsal motor nucleus of the glossopharyngeal and vagal nerves (noyau dorsal moteur du nerf vague), co: coeruleus-subcoeruleus complex (locus coeruleus), sn: substantia nigra (substance noire), mc: anteromedial temporal mesocortex (mésocortex temporal antéromédial), hc: high order sensory association areas and prefrontal fields (aires sensorielles et régions préfrontales), fc: first order sensory association areas, premotor areas, primary sensory and motor fields (aires sensorielles et associatives primaires, aires prémotrice et aires primaires sensorielles et motrices).

Causes de la maladie

La maladie de Parkinson est multi-causale et souvent multifactorielle. En effet, deux « formes » de la maladie de Parkinson peuvent être différenciées en fonction de leur origine génétique ou environnementale. Cependant, chez la majorité des patients, il existe une balance entre des facteurs génétiques et environnementaux qui influencent conjointement l'apparition de la maladie.

Les cas de patients atteints par une forme génétique de la maladie de Parkinson sont rares (environ 5% des patients). Différents gènes ont été identifiés comme étant à l'origine de la maladie lorsqu'ils sont mutés. Par exemple, des mutations ou des duplications du gène codant pour l'alpha-synucléine (SNCA) entraînent une maladie de Parkinson, transmissible sous un mode autosomique dominant (*Polymeropoulos et al., 1997*). D'autres gènes tels que LRRK-2 (leucine-rich repeat kinase 2) codant pour une kinase associée à la membrane mitochondriale

ou le gène codant pour la glucocerebrosidase, une hydrolase lysosomale, ont été identifiés comme des causes de la maladie de Parkinson.

Plus récemment, des études à très grande échelles dites GWAS (pour génome wide-association study) permettant de corrélérer des polymorphismes nucléotidiques à des facteurs de risque de développer la maladie ont été mises en place pour la maladie de Parkinson. Ces études se font sur des dizaines de milliers voir des centaines de milliers de personnes et ont donc une grande force statistique. Elles permettent ainsi de déceler des variants génétiques entraînant une susceptibilité, même faible, de développer la maladie. 41 loci de susceptibilité associés à la maladie de Parkinson ont ainsi été mis en évidence (*Chang et al., 2017*). Notons que les patients qui développent une maladie de Parkinson avant l'âge de 50 ans présentent généralement des facteurs de risque génétiques importants (*Tanner et al. 1999*).

De la même manière, il est rare de pouvoir déterminer un évènement environnemental unique causant directement la maladie de Parkinson. Cela a été possible en 1976, lorsque Barry Kidston s'est injecté du MPTP (1-méthyl-4phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridinie) qu'il avait lui-même synthétisé à la place du MPPP (1-méthyl-4phényl-4-propionoxypiperidine), une drogue illicite. Barry Kidston et d'autres consommateurs de cette drogue mal synthétisée développèrent en quelques jours des symptômes moteurs évocateurs d'une maladie de Parkinson avancée (syndrome parkinsonien). En effet, le MPTP est métabolisé en MPP+ qui interfère avec le complexe 1 de la chaîne respiratoire des mitochondries conduisant à une augmentation importante du stress oxydant et à la mort cellulaire. De plus, cette drogue cible spécifiquement les neurones dopaminergiques. Le MPTP est aujourd'hui encore utilisé dans les laboratoires de recherche comme modèle de la maladie de Parkinson et est à l'origine du développement des inhibiteurs de la monoamine oxydase B (MAO-B) utilisés pour traiter les symptômes parkinsoniens (*Langston, 2017*). Il a également été mis en évidence que l'exposition à certains pesticides, comme la roténone ou le paraquat est un facteur de risque important de développer cette maladie (*Tanner et al., 2011*). D'autres substances semblent en revanche avoir un rôle protecteur contre l'apparition de la maladie de Parkinson comme la consommation de café (*Ross et al., 2000*).

Les causes exactes de la maladie de Parkinson sont donc difficiles à déterminer car elles correspondent le plus souvent à un mélange de facteurs de risques environnementaux et génétiques qui agissent de concert pendant des années. Notons que le premier facteur de risque est l'âge. L'augmentation de l'espérance de vie, en particulier dans les pays les plus riches, tend donc à augmenter le nombre de personnes atteintes de cette maladie.

Incidence et prévalence

La maladie de Parkinson devient un véritable enjeu de santé public. En effet, en 2015 en France, 2,5 personnes sur 1000 de plus de 20 ans étaient traitées pour cette maladie. La prévalence (nombre de cas à un temps donné) de la maladie de Parkinson augmente considérablement avec l'âge pour atteindre environ 1% de la population française âgée de plus de 60 ans. Sur cette même année, l'incidence (nombre de nouveaux cas sur une période donnée) de patients atteints de la maladie de Parkinson en France était de 0,39 personne sur 1000 de plus de 20 ans. Cette incidence augmente également avec l'âge de la population considérée et atteint 1,37 pour 1000 parmi les personnes âgées de plus de 60 ans. Également, on observe une augmentation du nombre de patients parkinsoniens de l'ordre de 0,1/1000 entre l'année 2010 et l'année 2015 qui s'explique en grande partie par le vieillissement de la population (Moisan et al., 2018).

En conclusion, la maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative liée à l'âge touchant aujourd'hui 5 millions d'individus dans le monde. Cette maladie provoque des symptômes moteurs comme les tremblements de repos et une rigidité musculaire ainsi que certains symptômes non-moteurs. La caractéristique microscopique de cette maladie est la présence dans le cerveau des patients d'inclusions nommées corps de Lewy comportant de l'alpha-synucléine agrégée. Ces inclusions se propagent dans le cerveau au cours de la pathologie. On observe une neurodégénérescence progressive des zones touchées et en particulier des neurones dopaminergiques. L'altération de la quantité de dopamine présente dans la substance noire et le striatum cause les symptômes moteurs. L'origine de cette maladie est généralement multifactorielle, avec des causes génétiques et environnementales, le premier facteur de risque étant l'âge.

b. Les autres synucléinopathies

Il existe d'autres pathologies liées à la présence dans le cerveau d'agrégats d'alpha-synucléine. Ces pathologies sont moins répandues que la maladie de Parkinson et donc moins connues du grand public. Les différences avec la maladie de Parkinson en termes de symptômes sont en partie dues à des différences au niveau des régions cérébrales affectées. Nous allons décrire dans ces paragraphes les démences à corps de Lewy et l'atrophie multi-systématisée.

Les démences à corps de Lewy

Les démences de Lewy sont elles aussi caractérisées par la présence de dépôts anormaux d'alpha-synuclease dans les cellules cérébrales. Cette maladie affecte surtout les parties du cerveau liées aux fonctions cognitives et aux mouvements (structures limbiques et néocortex). Elle se rapproche donc, en termes de symptômes, de la maladie de Parkinson et de la maladie d'Alzheimer bien que son évolution ainsi que la détérioration des facultés mentales soient plus rapides. En effet, on considère que les patients présentant des signes de troubles cognitifs durant la première année suivant le diagnostic d'une « maladie de Parkinson » sont en réalité atteints de démence à corps de Lewy. Les principaux symptômes sont un déficit cognitif progressif associé à des troubles de la mémoire, des troubles du sommeil, des symptômes moteurs parkinsoniens (tremblements et rigidité) ainsi que des fluctuations de l'état cognitif ou de la vigilance (*Walker et al., 2019, McCann et al., 2014*). Cette maladie débute généralement un peu plus tardivement que la maladie de Parkinson (environ 70 ans pour les patients atteints de démences à corps de Lewy contre 60 ans pour les patients atteints de la maladie de Parkinson) mais est plus agressive, l'espérance de vie des patients n'étant que de 5 à 7 ans post diagnostic. La démence à corps de Lewy est la seconde démence la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer (environ 20% des cas de démences). D'après le site France Alzheimer, près de 200 000 personnes en France seraient atteintes par cette maladie (0,3% de la population) et 67% des malades ne seraient pas diagnostiqués !

L'atrophie multisystématisée

Comme chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, l'atrophie-multi systématisée se déclare en moyenne à 60 ans. Cependant, l'espérance de vie des patients n'est que de 6 à 9 ans contre 12 ans pour les patients atteints de la maladie de Parkinson. L'atrophie multisystématisée est une maladie neurodégénérative rare qui touche 2 à 5 personnes sur 100 000 en France.

L'atrophie multisystématisée affecte plusieurs régions du cerveau (substance noire, cervelet, cortex frontal) et peut provoquer des troubles différents d'une personne à l'autre en fonction des régions affectées. Les symptômes de cette maladie sont un syndrome parkinsonien (tremblements et rigidité), une ataxie cérébelleuse (non-coordination des mouvements) ainsi que des problèmes de régulation de la pression sanguine ou du système urinaire et génital dû à une atteinte du système nerveux autonome. Cette maladie est sous divisée en deux types en fonction des symptômes qui prédominent : l'atrophie multisystématisée de forme C

(cérébelleuse) lorsque les symptômes d'ataxie prédominent et de forme P (parkinsonienne) lorsque les symptômes parkinsoniens sont majoritaires.

D'un point de vue microscopique, les inclusions oligodendrogiales sont caractéristiques de l'atrophie multi-systématisée mais l'on retrouve également des agrégats d'alpha-synucléine dans les neurones et les astrocytes (comme pour la maladie de Parkinson et les démences à corps de Lewy) (McCann et al, 2014).

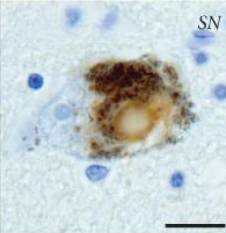
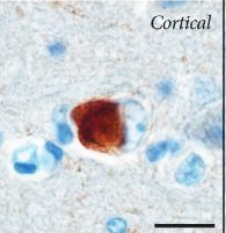
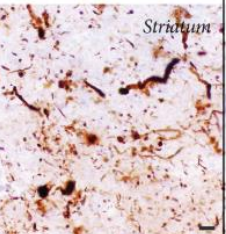
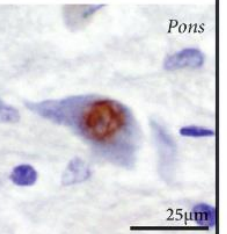
Clinical	Parkinson's disease (PD)	Dementia with Lewy bodies (DLB)	Multiple System Atrophy (MSA)
Age of Onset (years)	~60	~70	~60
Duration (years)	~12	~5	6-9
Motor signs	All	Some	All
L-dopa responsive	Yes	Variable	No
Non-motor signs			
Autonomic	Late	Late	Early
Hallucinations	Late	Early	No
Olfactory dysfunction	Early	Early	No
Dementia	Late	Early	No
Main synucleinopathies	NCIs	NCIs	GCI
	 SN	 Cortical	 Pons
	 Striatum	 Striatum	 Pons

Figure 3: Caractéristiques des synucléinopathies

Issue de McCann et al, (2014), Tableau regroupant les principales caractéristiques de la maladie de Parkinson, des démences à corps de Lewy et de l'atrophie multi-systématisée.

En conclusion, en plus de la maladie de parkinson (MP) d'autres pathologies comme les démences à corps de Lewy (DLB) ou l'atrophie multi-systématisée (AMS) sont liées à la présence dans le cerveau des patients d'alpha-synucléine agrégée. Les principales différences entre ces pathologies sont l'âge d'apparition de la maladie (environ 60 ans pour la MP et l'AMS contre 70 ans pour les DLB), les symptômes avec en particulier la

présence (MP et DLB) ou non (AMS) de signes moteurs ainsi que les cellules et régions cérébrales atteintes (Figure 3).

c. Méthodes de diagnostic

Le diagnostic et la distinction entre les différentes synucléinopathies restent aujourd'hui encore difficiles et tardifs dans le développement de la pathologie. En effet, l'examen se fait majoritairement par rapport aux symptômes des patients qui arrivent relativement tardivement dans le développement de la maladie et peuvent être communs à plusieurs maladies neurodégénératives. Par exemple, chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, les symptômes les plus caractéristiques apparaissent alors qu'au moins 50% des neurones dopaminergiques de la substance noire ont déjà disparu. De plus, les synucléinopathies peuvent présenter un certain nombre de signes communs les rendant difficilement discernables. On estime en effet qu'un patient sur quatre diagnostiqué comme atteint de la maladie de Parkinson au cours de sa vie était en réalité atteint d'une autre pathologie (*Marsili et al., 2018*). Le diagnostic assuré d'une synucléinopathie ne peut être posé pour l'instant qu'après une autopsie *post-mortem*.

Bien qu'il n'y ait pas encore de traitement capable de ralentir la propagation de la pathologie, un diagnostic précoce des synucléinopathies est fondamental pour la prise en charge des patients et éventuellement pour les inclure dans des essais cliniques. En effet, il est probable qu'un certain nombre de traitements testés n'aient pas montré l'effet escompté car ils sont testés sur des patients à des stades trop avancés de la pathologie.

Afin de faciliter le diagnostic des patients, la « Movement Disorder Society » ainsi que d'autres sociétés ont publié des listes de critères de diagnostics (critères d'inclusions et critères d'exclusions) précis basés sur les récentes découvertes dans le domaine (*Postuma et al., 2015*) incluant ainsi dans le diagnostic les symptômes prodromaux non-moteurs. Il est également essentiel de ré-évaluer le diagnostic initialement posé au cours de l'évolution de la maladie (*Marsili et al., 2018*).

Diagnostic de la maladie de Parkinson

Le diagnostic de la maladie de Parkinson est généralement basé sur l'examen des symptômes cliniques. Le critère essentiel pour le diagnostic d'une maladie de Parkinson est la bradykinésie. Les patients doivent également présenter au moins un symptôme supplémentaire parmi les

tremblements de repos et la rigidité musculaire. Certains signes avant-coureurs de la maladie comme l'anosmie, la constipation, les troubles du sommeil paradoxal, la fatigabilité, les difficultés de concentration ou la dépression peuvent également être pris en compte bien que ces signes soient discrets et peu spécifiques. Seul la micrographie (écriture de plus en plus petite), très rarement détectée par l'entourage ou le patient, est un symptôme avant-coureur spécifique de la maladie de Parkinson. La réponse du patient au traitement par la levodopa, un précurseur de la dopamine, est généralement utilisée pour confirmer le diagnostic clinique de la maladie de Parkinson. Il existe une hétérogénéité de symptômes importante chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (prédominance des symptômes moteurs, absence de symptômes moteurs etc.) suggérant l'existence de plusieurs types de maladies de Parkinson. Une stratification plus importante des patients est essentielle à la mise en place d'un traitement adapté. Des examens d'imagerie tel que le scanner, l'IRM (imagerie par résonance magnétique) ou la scintigraphie cérébrale par DatScan (exploration de la densité des transporteurs de la dopamine) peuvent également être utilisés pour confirmer le diagnostic (*Marsili et al., 2018, Postuma et al, 2015, France Parkinson, 2020*).

Diagnostic des démences à corps de Lewy

Il existe de nombreuses erreurs de diagnostic des démences à corps de Lewy, souvent confondues avec la maladie d'Alzheimer. Pour diagnostiquer de la manière la plus fiable possible cette pathologie, différents outils sont utilisés comme l'analyse des symptômes, l'imagerie cérébrale, l'imagerie nucléaire ou alors l'identification de biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer (dosage des protéines Tau totales, Tau hyperphosphorylées et du peptide bêta amyloïde 1-42) du liquide céphalorachidien par ponction lombaire. Notons qu'il n'existe pas de biomarqueur connu des démences à corps de Lewy ; les ponctions lombaires sont donc utilisées pour écarter l'hypothèse d'une maladie d'Alzheimer.

La condition nécessaire au diagnostic d'une démence à corps de Lewy est l'existence d'un trouble cognitif évolutif suffisant pour interférer avec les activités de la vie courante. Les autres symptômes principaux sont les troubles de la mémoire (évocateurs d'une maladie d'Alzheimer) et les troubles attentionnels et visuo-spatiaux. Les critères associés à cette maladie sont la fluctuation des troubles cognitifs, les hallucinations visuelles et le parkinsonisme (tremblement, hypertonie et/ou akinésie). Il existe également d'autres critères évocateurs de la maladie : les troubles du sommeil paradoxal (ou REM pour « rapid eye movement », rêves colorés et effrayants sans atonie musculaire associés à une agitation importante du dormeur), la sensibilité

accrue aux neuroleptiques et une diminution du transporteur de la dopamine visible par imagerie fonctionnelle. Notons que les troubles du sommeil paradoxal apparaissent généralement de manière précoce dans la pathologie et suggèrent une synucléinopathie bien qu'ils ne soient pas spécifiques d'une démence à corps de Lewy. Les critères associés souvent présents lors d'une démence à corps de Lewy sont une dysautonomie sévère (une hypotension orthostatique, une instabilité cardia-circulatoire neurovégétative, une incontinence urinaire, une constipation, une asthénie et des troubles de la déglutition), des chutes répétées, des pertes de connaissance brèves, des hallucinations, un délire systématisé, une dépression. Les démences à corps de Lewy diffèrent de la maladie de Parkinson par le fait que dans cette maladie, la démence précède ou apparaît en même temps que le syndrome parkinsonien. Également, la réponse à la L-Dopa sera plus faible et fait partie des critères d'exclusion du diagnostic d'une maladie de Parkinson (*Faucher, 2005*).

De la même manière que pour la maladie de Parkinson, les techniques d'imagerie peuvent être utilisées pour aider au diagnostic. L'IRM permet d'observer une atrophie mésencéphalique et la scintigraphie cérébrale avec le ioflupane permet l'étude du système dopaminergique. L'observation d'une sévère dégénérescence de la voie nigrostriée permet d'exclure une maladie d'Alzheimer (*Delmaire et al., 2009*).

Diagnostic de l'atrophie multi-systématisée

Comme pour la maladie de Parkinson et les démences à corps de Lewy, ce sont les symptômes cliniques qui sont majoritairement utilisés pour poser un diagnostic. Concernant l'atrophie multi-systématisée, il existe trois familles de symptômes majoritaires : la dysautonomie liée à l'atteinte du système nerveux autonome, le syndrome parkinsonien et les signes cérébelleux. Cette maladie est divisée en deux formes, l'atrophie multi-systématisée de type P pour parkinsonienne ou de type C pour cérébelleuse où prédominent respectivement les symptômes parkinsoniens ou cérébelleux.

La dysautonomie correspond à une altération du système nerveux autonome. Dans cette maladie, cela se traduit notamment par une hypotension orthostatique (baisse brutale de la pression artérielle lorsque le patient se lève), des troubles du système cardiaque, une baisse de la production de sueur et de larmes ainsi que des difficultés de déglutition. Des troubles du sommeil peuvent également apparaître précocement comme pour la maladie de Parkinson ou les démences à corps de Lewy. On observe également en début de maladie des dysfonctionnements urinaires ou érectiles.

Le syndrome parkinsonien correspond à l'apparition d'une bradykinésie ou akinésie (lenteur et réduction de l'amplitude des gestes), des tremblements de repos, une rigidité anormale. On observe aussi chez les patients une démarche et une élocution qui deviennent lentes et difficiles.

Les signes cérébelleux sont caractérisés par une incoordination des mouvements entraînant une démarche titubante et instable. On observe également une maladresse dans les membres supérieurs, un tremblement et des mouvements involontaires et saccadés des yeux.

L'imagerie cérébrale par IRM permet d'observer une atrophie cérébelleuse et mésencéphalique ainsi que des anomalies putaminales permettant l'exclusion d'une maladie de Parkinson. La scintigraphie cardiaque à la 123I-MIBG (métaïdobenzylguanidine, un analogue de la noradrénaline) peut également permettre la distinction entre une maladie de Parkinson (diminution globale de la fixation du 123I-MIBG) et une atrophie multi-systématisée (fixation normale du traceur) (*Levigoureux, 2015*).

En conclusion, il apparaît absolument nécessaire de mettre en place des marqueurs fiables et spécifiques de chacune de ces pathologies afin de pouvoir diriger les patients vers les traitements les plus appropriés. Un diagnostic certain et précoce est également indispensable pour l'élaboration d'essais cliniques dans le but de tester de nouvelles molécules et de pouvoir potentiellement envisager un traitement curatif de ces pathologies.

d. Les traitements actuels

Il n'existe actuellement pas de traitement curatif des synucléinopathies ni de traitement permettant de ralentir la propagation de ces pathologies. Les traitements utilisés sont uniquement symptomatiques.

Traitement de la maladie de Parkinson

Pour la maladie de Parkinson, les traitements tendent majoritairement à compenser la diminution de dopamine dans le cerveau. En effet, les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson sont liés à la dégénérescence des neurones de la substance noire *pars compacta*. Ces neurones participent au bon fonctionnement de la voie nigro-striée impliquée dans le contrôle des mouvements. En effet, lors de l'initiation d'un mouvement, le cortex envoie du glutamate

en direction du striatum afin de l'activer. Celui-ci va alors libérer un neurotransmetteur inhibiteur appelé GABA (Gamma-AminoButyrique Acide) en direction du globus pallidus interne (voie directe). Le globus pallidus exerce en continu une action inhibitrice vers le thalamus, cette inhibition est alors levée et permet l'activation de la voie cortico-spinale et le mouvement. Parallèlement, le striatum va lever l'inhibition du noyau subthalamique qui lui, aura une action activatrice sur le globus pallidus interne et inhibe alors le thalamus afin de contrôler le mouvement (voie indirecte). La libération de dopamine par la substance noire *pars compacta* permet le renforcement de la voie directe ou le frein de la voie indirecte. Lorsque les neurones de la substance noire dégénèrent, il va y avoir une altération dans la quantité de dopamine libérée vers le striatum entraînant une perte de contrôle des mouvements. L'inhibition excessive du thalamus par la voie indirecte va provoquer les symptômes de rigidité alors que la carence en dopamine va entraîner une dépolarisation des neurones du striatum et les tremblements. La figure 4 décrit le fonctionnement global de cette voie nigro-striée et les altérations liées à la dégénérescence des neurones de la substance noire dans un contexte parkinsonien.

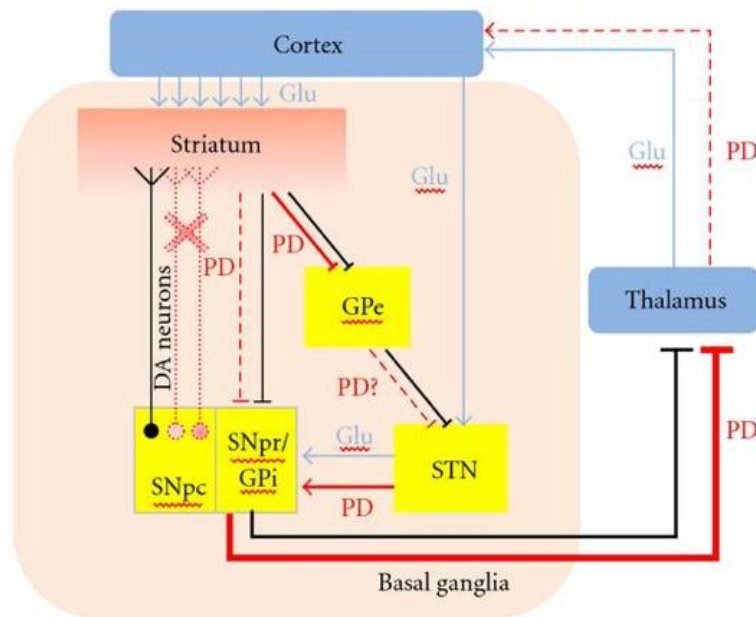


Figure 4: Système dopaminergique

Issue de Zinger et al., 2011. Représentation schématique de l'organisation des ganglions de la base en condition normale (en noir) et dans un contexte de maladie de Parkinson (en rouge). PD : Parkinson's disease, Glu : glutamate, Da : dopamine, GPe : Globus Pallidus externe, GPi : Globus Pallidus interne, SNpc : substance noire pars compacta, SNpr : substance noire pars reticula.

La stratégie thérapeutique afin de limiter les symptômes moteurs dans la maladie de Parkinson est donc de compenser la diminution de la dopamine dans le cerveau. Pour cela, différents traitements sont disponibles.

Historiquement, la première molécule à avoir été utilisée est la lévodopa (ou L-Dopa, L-3,4-dihydroxyphenylalanine). La L-Dopa est un précurseur de la dopamine et a l'avantage, contrairement à la dopamine, de pouvoir traverser la barrière hémato-encéphalique. La L-Dopa peut alors atteindre le cerveau où elle est transformée en dopamine par l'action de la DOPA-décarboxylase. De manière intéressante, ce traitement avait d'abord été prescrit par George Cotzias afin de repigmenter le cerveau en restaurant la perte de neuromélanine. Il s'est trouvé efficace pour lutter contre les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson mais ne repigmente pas la substance noire.

La L-Dopa doit être administrée en doses croissantes pour éviter des effets secondaires gastro-intestinaux importants. Des inhibiteurs des dopa-décarboxylases périphériques sont également administrés en plus de la L-Dopa afin de limiter ces effets gastro-intestinaux et d'augmenter la disponibilité de la L-Dopa pour le cerveau. Ce traitement a une très bonne efficacité contre les symptômes d'akinésie et diminue également les tremblements pendant les 3 à 6 premières années. A la suite de ces années dites « de lune de miel », les patients oscillent entre des phases ON et des phases OFF (état parkinsonien). Au bout d'une dizaine d'années de traitement, des effets secondaires importants tel que la dyskinésie (mouvements involontaires) avec des mouvements de type choréique apparaissent (chez 80% à 90% des patients après 10 ans de traitement !!!). Des modifications comportementales (irritabilité, hostilité, paranoïa, insomnies etc.) peuvent aussi être observées (*Fahn, 2008, Cotzias et al., 1967*). En fait, la capacité des neurones à utiliser la L-Dopa diminue au fur et à mesure de la dégénérescence dopaminergique. En effet, au cours du développement de la maladie, de moins en moins de fibres dopaminergiques sont capables (1) de transformer la L-Dopa en dopamine et (2) d'assurer le rétrocontrôle de la libération de la dopamine. En résumé, l'augmentation de la quantité cérébrale de dopamine n'est plus suffisante pour diminuer les symptômes moteurs puisque le cerveau n'est plus capable de l'utiliser correctement.

Afin de retarder au maximum l'apparition des effets secondaires liés à la L-Dopa, sa prise peut être remplacée par des agonistes dopaminergiques à des stades précoces de la maladie ou associée à ces agonistes à des stades plus tardifs. D'autres molécules comme les inhibiteurs des enzymes de dégradation de la dopamine (cathécol-O-méthyl-transférase ou monoamine

oxydase B) peuvent également stabiliser le taux de dopamine cérébrale. Des anticholinergiques qui bloquent l'action de l'acétylcholine (qui a une action opposée à celle de la dopamine) sont parfois également prescrits.

Une autre stratégie non-médicamenteuse utilisée pour retarder la prise de L-Dopa est la stimulation cérébrale profonde du noyau sous-thalamique, du globus pallidus interne ou du noyau intermédiaire du thalamus. Cette méthode consiste à implanter par chirurgie des électrodes dans le cerveau du patient qui vont délivrer un courant électrique de faible intensité (*Bastide et Bézard, 2015*). Bien que l'évolution de la pathologie ne soit pas stoppée, l'amélioration motrice globale est de 54% pendant 5 ans. Les patients retrouvent donc une phase « ON » pendant plusieurs années. La sélection des patients admis pour ce type de traitement est cependant assez drastique à cause des risques que comporte ce type d'opération. Les patients doivent présenter une bonne réponse au traitement par la dopamine mais avec des fluctuations importantes d'efficacité ou avec des effets secondaires au traitement importants et être âgés de moins de 70 ans. Ils doivent également ne pas présenter de troubles de la conscience, de problèmes d'addiction ou de dépression. Ce traitement entraîne une amélioration des symptômes moteurs pendant 5 à 10 ans mais peut également engendrer des effets indésirables importants (troubles de l'élocution, prise de poids, apathie, dépression, crises maniaques ...) (*Fleury et al., 2015*).

Enfin, le mode de vie du patient va pouvoir influencer le développement de la pathologie. Par exemple, l'activité physique, dans la limite du possible, et encadrée si nécessaire par un professionnel de santé, doit être encouragée. En effet, l'exercice permet une diminution du stress oxydant, promeut la plasticité cérébrale et améliore également l'humeur (*Setzinger et al., 2013*).

Traitement des démences à corps de Lewy

Comme nous l'avons dit précédemment, il n'existe pas non plus de traitement capable de soigner les démences à corps de Lewy. La prise en charge n'est que symptomatique et n'empêche pas le développement de la pathologie. Le traitement des démences à corps de Lewy sont axés sur les symptômes cognitifs, psychiatriques et moteurs. Cependant, dans le cadre de cette pathologie, les traitements médicamenteux pour chaque symptôme doivent être prescrits avec prudence car ils peuvent interférer avec les autres symptômes de la maladie. Pour les symptômes cognitifs, des inhibiteurs de la cholinestérase, également prescrits pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont indiqués et montrent une efficacité plus

importante que pour les patients Alzheimer. Ces inhibiteurs de cholinestérase pourraient également réduire l'apathie et diminuer les hallucinations visuelles. Certains antidépresseurs peuvent être prescrits pour lutter contre les troubles du comportement (anxiété, dépression, hallucinations) mais avec une grande prudence car les antipsychotiques (de première génération notamment) causent des effets secondaires dangereux (risque de confusion, chutes). Pour le traitement des symptômes moteurs, comme pour la maladie de Parkinson, la L-Dopa est prescrite mais à des doses très faibles car elle peut aggraver les symptômes psychiatriques comme les hallucinations. Malheureusement, les patients atteints de démences à corps de Lewy répondent souvent moins bien aux traitements dopaminergiques que les patients atteints de la maladie de Parkinson.

Également, les prises en charges non-médicamenteuses tel que l'orthophonie et la kinésithérapie sont très utiles pour que le patient conserve son autonomie le plus longtemps possible. Comme pour la maladie de Parkinson l'exercice physique mais aussi les exercices mentaux (mots croisés, jeux de logique etc.) doivent être largement encouragés car ils ont montré des effets bénéfiques sur les symptômes moteurs, cognitifs et psychiatriques (*McKeith et al., 2017*).

Traitement de l'atrophie multi-systématisée

Encore une fois, il n'existe aucun traitement curatif contre cette maladie mais seulement des traitements symptomatiques. Les symptômes moteurs sont traités, comme pour la maladie de Parkinson, avec des médicaments permettant d'augmenter la quantité de dopamine dans le cerveau comme la L-Dopa. Ce traitement est cependant moins efficace que pour les patients atteints d'une maladie de Parkinson (efficace chez 30% des malades pendant environ 5 ans) et nécessite des doses plus importantes. L'hypotension orthostatique, les troubles urinaires, les troubles de l'érection, la constipation, les troubles de la déglutition, les troubles du sommeil et les problèmes cardio-vasculaires sont également traités grâce à différents médicaments non spécifiques de l'atrophie multi-systématisée. Des mesures non médicamenteuses comme l'utilisation de bas de contention et l'élévation de la tête du lit pour éviter l'hypotension orthostatique ou la mise en place d'une sonde urinaire si nécessaire peuvent être conseillées. Également, la kinésithérapie respiratoire, l'exercice physique, l'orthophonie et un régime alimentaire sain vont permettre l'amélioration de certains symptômes (*Moretti, 2019*).

En conclusion, il y a un manque évident de traitements curatifs des synucléinopathies. Les méthodologies actuellement mises en place n'agissent que sur les symptômes et ne ralentissent ni n'arrêtent en aucun cas le développement de ces pathologies. Il apparaît donc essentiel de développer des molécules curatives efficaces.

e. Les traitements expérimentaux

Aux vues de l'absence de traitement curatif, de l'augmentation croissante des personnes atteintes, et des handicaps engendrés par ces maladies, il est absolument nécessaire et urgent de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Nous allons ici en détailler quelques-unes qui sont actuellement en phase clinique.

Une première approche est celle du professeur David Devos qui a publié en 2014 les résultats d'une étude pilote utilisant le déféripone chez les patients atteints de la maladie de Parkinson en complément d'un traitement dopaminergique. Le déféripone est un médicament chélateur du fer. En effet, il a été montré que les patients atteints de la maladie de Parkinson ou d'atrophie multi-systématisée présentent une quantité anormalement élevée de fer au niveau des ganglions de la base (*Dexter et al., 1991*). Le fer sous forme Fe^{2+} via la réaction de Fenton potentialise la formation d'espèces réactives de l'oxygène et donc entraîne une augmentation du stress oxydant. De plus, le fer est capable de réagir avec la dopamine entraînant la production de dérivés quinones de la dopamine. Ces dérivés ont une action délétère sur le protéasome (impliqué dans la dégradation des protéines mal conformées) et sur le glutathion (tripeptide permettant le maintien du potentiel redox de la cellule). Ils promeuvent également l'augmentation du stress oxydant via les mitochondries (*Zucca et al., 2015*). De plus, le fer (comme d'autres métaux) est capable d'interagir avec l'extrémité C-terminale de l'alpha-synucléine et de promouvoir son agrégation (*Uversky et al., 2001*). L'étude pilote montre un effet neuroprotecteur du déféripone sur des modèles cellulaires, animaux (souris MPTP modèle de Parkinson). Chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, une diminution de la quantité de fer labile dans la substance noire ainsi qu'une amélioration des symptômes moteurs sont observées au bout de quelques mois sans effet indésirable notable (*Devos et al., 2014*). Ce traitement pourrait donc ralentir la propagation de la maladie. Notons que le déféripone est un traitement qui est habituellement utilisé par des patients atteints d'anémie. Nous pouvons donc nous attendre à ce qu'il n'y ait pas d'effets secondaires importants même à long terme. Une seconde étude d'échelle européenne (FairPark II) est actuellement en cours.

Un autre type d'approche prometteuse pour lutter contre les synucléinopathies est l'immunothérapie. Le traitement des maladies neurodégénératives par immunothérapies passives ou actives se développent depuis une vingtaine d'années. La meilleure compréhension du mécanisme d'action de ces pathologies et la mise en évidence du rôle de l'alpha-synucléine dans les synucléinopathies ont permis la mise en place de ces approches.

L'immunothérapie active consiste à injecter chez le patient de l'alpha-synucléine ou des peptides d'alpha-synucléine afin d'activer les lymphocytes qui déclencheront une réponse immunitaire anti-alpha synucléine pathologique spécifique à la manière d'un vaccin. La première expérience de ce type a été mise en place par Masliah et al. qui ont vacciné des souris transgéniques produisant de l'alpha-synucléine humaine. Ils ont ainsi observé une diminution des agrégats d'alpha-synucléine dans les neurones de ces souris qui seraient dégradés par le lysosome (*Masliah et al., 2005*). C'est à la suite de ces découvertes que le projet européen SYMPATH a pu être mis en place. Deux molécules, PD01A et PD03A correspondant à de courts peptides imitant la séquence de l'extrémité C-terminale de l'alpha-synucléine et conçues pour obtenir des anticorps neutralisants les formes toxiques de l'alpha-synucléine ont réussi la phase clinique 1. L'avantage de l'immunisation active est qu'elle peut être mise en place à grande échelle, avec une administration simple et peu fréquente, et présente un coût relativement faible. En revanche, la force de réponse de chaque individu reste difficilement prévisible et le passage de la barrière hémato-encéphalique par ces anticorps produits en périphérie est faible (0,1% à 1%). Également, ce type d'immunothérapie présente un risque de déclenchement d'une réponse inflammatoire. Enfin, un autre inconvénient de cette stratégie est le risque d'entraîner une réponse immunitaire également dirigée contre l'alpha-synucléine physiologique non agrégée. Ce type d'immunisation pourrait être plutôt utilisée à grande échelle à titre préventif ou à des stades très précoces de la pathologie (*Schneberger et al., 2016*).

L'immunothérapie passive consiste à injecter directement des anticorps qui fixeront spécifiquement l'alpha-synucléine pathologique présente dans l'environnement extracellulaire. Celle-ci sera ensuite digérée par les macrophages permettant ainsi de diminuer la propagation de la pathologie. Le problème du passage de la barrière hémato-encéphalique est ici plus facilement surmontable car il est possible de synthétiser des anticorps à domaine unique capables de traverser cette barrière. Plusieurs approches de ce type ont été testées en clinique chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer en utilisant des anticorps ciblant la protéine bêta-amyloïde ou la protéine Tau (Tubulin Associated Unit) qui sont impliquées dans cette maladie (*Plotkin et al., 2020*). Ces immunothérapies passives n'ont pas montré l'efficacité escomptée. Les problématiques cruciales de ce type de traitement sont 1) la spécificité des

anticorps générés 2) la discrimination des différents sous-types de synucléinopathies voir des sous-types intra-synucléinopathies. En effet, l'alpha-synucléine pourrait s'agréger selon différents types de fibres ou souches en fonction de la pathologie, ce qui expliquerait au moins en partie la diversité des synucléinopathies (*Peelaerts et al., 2015*) (ce phénomène sera détaillé dans les chapitres suivants). Cela suggère qu'une thérapie pourrait être efficace sur une synucléinopathie en ciblant la souche d'alpha-synucléine spécifique de cette maladie. Cette même thérapie ne serait potentiellement pas efficace sur les autres synucléinopathies. Il est même envisageable que les souches d'alpha-synucléine diffèrent entre des individus présentant le même diagnostic clinique ou que différentes souches coexistent chez un même individu. Notons également que l'alpha-synucléine est présente sous des formes modifiées (troncatures, phosphorylation, acétylation...) qui ne seront donc pas toutes reconnues par un anticorps anti-alpha-synucléine. Ce type de traitement a montré des résultats encourageants sur des cultures cellulaires ou des modèles animaux menant à l'élaboration de la molécule PRX002. PRX002, un anticorps produit par la société ROCHE, est actuellement en phase clinique II. Cet anticorps cible spécifiquement l'extrémité C-terminal de l'alpha-synucléine au niveau des acides aminés 118 à 126 et serait capable de prévenir l'agrégation et la propagation de l'alpha-synucléine. L'extrémité C-terminal semble accessible dans l'ensemble des formes agrégées de l'alpha-synucléine. De plus, cette extrémité n'est pas impliquée dans la liaison de l'alpha-synucléine à la membrane, c'est pourquoi cet épitope a été choisi. Notons cependant que cette extrémité est régulièrement tronquée dans le cerveau des patients (15 à 30% des formes, *Kellie et al., 2014*). Ce phénomène risque de limiter la liaison de l'anticorps aux agrégats d'alpha-synucléine. Les premiers résultats chez des volontaires sains montrent que cette molécule est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et est bien tolérée à différentes doses sans effet secondaire sérieux. PRX002 permet de moduler la quantité d'alpha-synucléine retrouvée dans le sérum (*Jankovic et al., 2018*). L'efficacité de cette molécule prometteuse chez les patients reste donc à démontrer. Un second anticorps est actuellement en phase clinique, le BIIB054 (*Brys et al., 2019*). Cet anticorps cible l'extrémité N-terminale de l'alpha-synucléine (entre les acides aminés 1 à 10). Notons que cette région est également retrouvée tronquée chez les patients mais en quantité moins importante que l'extrémité C-terminale (*Kellie et al., 2014*). Cependant, il semblerait que cette extrémité soit repliée en feuillet bêta et donc peu accessible dans certaines souches d'alpha-synucléine (*Gath et al., 2012*).

En conclusion, l'utilisation de l'immunothérapie passive comme traitement des maladies neurodégénératives semble très prometteuse. Les difficultés techniques liées au passage

de la barrière hémato-encéphalique de ces molécules sont en train d'être surpassées par l'utilisation d'anticorps à domaine unique. Dans le cas des synucléinopathies, le défi est donc de déterminer des épitopes qui puissent être très spécifiques de chacune des souches d'alpha-synucléine afin de pouvoir arrêter leur propagation sans altérer la physiologie normale de la protéine. D'autres types d'approches comme la thérapie génique ou l'utilisation de cellules souches que nous ne détaillerons pas ici sont également envisagées.

2. L'alpha-synucléine physiologique et pathologique

Comme nous l'avons vu dans la première partie, l'alpha-synucléine joue un rôle central dans les synucléinopathies. Nous allons décrire dans cette partie son rôle et sa structure en condition physiologique. Nous nous intéresserons ensuite aux caractéristiques de l'alpha-synucléine en condition pathologiques.

a. Rôle et structure physiologique

L'alpha-synucléine est une petite protéine composée chez l'homme de 140 acides-aminés. Elle a été identifiée en 1988 par l'équipe de Maroteaux dans le noyau et dans les terminaisons pré-synaptiques des neurones d'une raie électrique (*Maroteaux et al., 1988*). Cette protéine, ainsi que la bêta synucléine, ont ensuite été retrouvées chez l'humain, avec une expression majoritairement cérébrale (bien qu'elle soit également fortement exprimée dans le sang) (*Jakes et al., 1994*). L'alpha-synucléine est intra-cellulaire ou associée à la membrane et localisée dans le cerveau au niveau pré-synaptique. La famille des synucléines est composée de trois protéines, l'alpha-synucléine, la bêta-synucléine et la gamma-synucléine. Ces protéines sont codées par trois gènes distincts. En particulier, le gène SNCA localisé sur le chromosome 4 (4q21-q23) code pour l'alpha-synucléine (*Chen et al., 1995*). L'alpha-synucléine fait partie de ce qu'on appelle les protéines intrinsèquement désordonnées, c'est à dire qu'elle n'a pas de structure tridimensionnelle définie en solution (*Weinreb et al., 1996*).

Structure de l'alpha synucléine en condition physiologique

La structure primaire de cette protéine est artificiellement divisée en 3 domaines (figure 5). L'extrémité N-terminale de l'alpha-synucléine est composée des acides aminés 1 à 60 et

contient quatre des sept répétitions imparfaites du motif KTKEGV. Ces répétitions sont prédictives d'une structure secondaire en hélice alpha amphipathique et présentent des similarités de séquence avec le domaine de liaison aux lipides des apolipoprotéines. En effet, en présence de petites vésicules formées de phospholipides acides, cette région présente une ou deux hélices alpha et lie ces vésicules (*Davidson et al., 1998*). De manière intéressante, la mutation A30P associée à la maladie de Parkinson empêche la formation de cette hélice alors que la mutation A53T (également associée à la maladie) a plutôt tendance à promouvoir ce repliement (*Jensen et al., 1998*). L'utilisation de la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) a permis de confirmer que l'alpha-synucléine a la capacité de former une structure hélicoïdale transitoire en présence de micelles de SDS (sodium dodécyl sulfate), spécialement entre les acides aminés 6 et 37 (*Eliezer et al., 2001*).

La région centrale de l'alpha-synucléine nommée « NAC » pour « Non Amyloid- β Component » comprends les acides aminés 61 à 95. Cette partie de la protéine est hautement hydrophobe et essentielle à l'agrégation de la protéine. En effet, la protéine bêta-synucléine qui présente une homologie de séquence importante avec l'alpha-synucléine (78%) à l'exception des résidus 73 à 83 ne s'agrège pas. La bêta synucléine serait même capable d'inhiber la fibrillation de l'alpha-synucléine (*Uversky et al., 2002*). La région du NAC est capable de s'assembler en feuillet bêta et de promouvoir l'agrégation de l'alpha-synucléine pour constituer le squelette des fibres (*Rodriguez et al., 2015*).

Enfin, l'extrémité C-terminale de l'alpha-synucléine correspond aux acides aminés 96 à 140. C'est une région riche en proline et en résidus acides et donc chargée négativement. Cette extrémité présente une flexibilité importante lui permettant de lier différents ions métalliques, d'autres protéines ou même son propre domaine NAC (*Binolfi et al., 2006*). La liaison de la région C-terminale au NAC inhibe l'agrégation de l'alpha-synucléine. En revanche, la troncature de cette extrémité C-terminale promeut fortement la nucléation et l'élongation de la protéine (*Gallardo et al., 2020*). Notons que cette région présente une homologie avec le domaine alpha-cristalline des protéines HSP (heat shock proteins) suggérant un rôle de l'alpha-synucléine en tant que chaperon moléculaire (*Doohun Kim et al., 2004*).

Bien que l'alpha-synucléine soit régulièrement décrite comme une protéine monomérique intrinsèquement désordonnée, une étude de 2011 montre que qu'elle pourrait s'assembler sous forme de tétramères. En effet, lorsque cette protéine est analysée en conditions non-dénaturantes et après pontage chimique, elle présente une masse de 58 kDa. Ces tétramères présenteraient une structure en hélice-alpha sans ajout de lipides et une meilleure capacité de

liaison aux lipides. L'agrégation de ces tétramères est également beaucoup plus difficile que celle des monomères. Cette étude montre que la forme tétramérique serait la forme majoritaire dans les globules rouges humains (Bartels et al., 2011). Notons qu'il est également possible que ces « tétramères » correspondent à l'alpha-synucléine liée à une autre protéine.

L'état natif de cette protéine reste donc encore largement débattu. L'ensemble de ces études suggèrent que l'alpha-synucléine existe, en condition physiologique, sous différentes conformations en équilibre dynamique. Différents états de la protéine (monomériques, oligomériques, transitoirement repliée) pourraient ainsi co-exister. De plus, l'existence de multiples partenaires d'interactions de l'alpha-synucléine influence également son repliement, rendant d'autant plus difficile l'étude de cette protéine (Dehay et al., 2015).

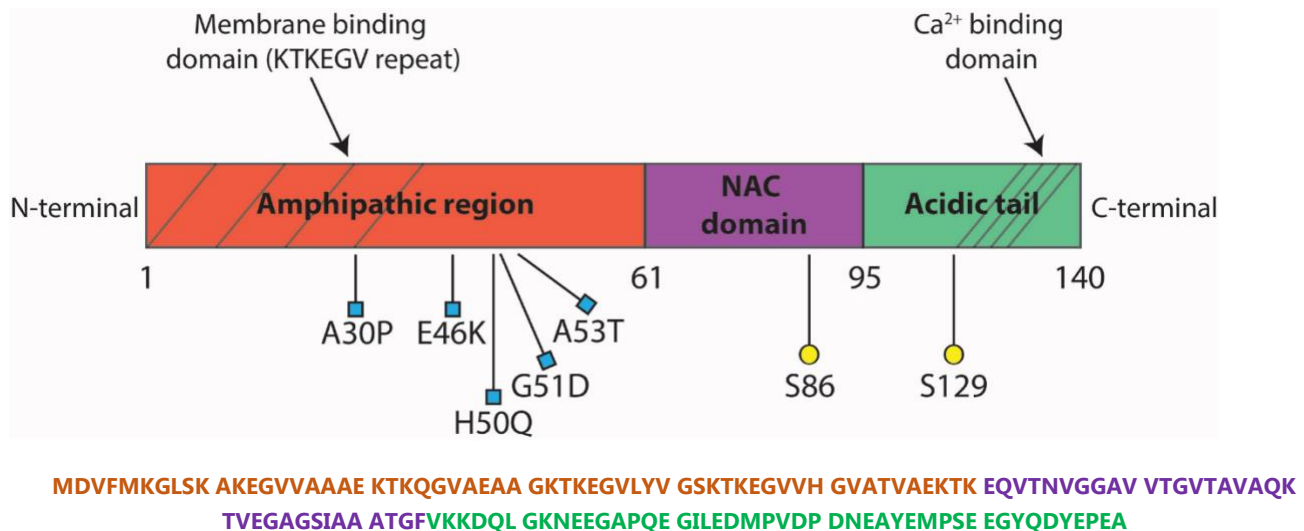


Figure 5: Organisation primaire de l'alpha-synucléine

Modifiée de de Emanuele M. et Chieragatti E., Biomolecules 2015, Représentation des trois domaines de l'alpha-synucléine avec en orange l'extrémité N-terminale, en violet la région NAC (Non Amyloid Compound) et en vert l'extrémité C-terminale. Les mutations connues associés aux formes familiales de la maladie de Parkinson sont représentées (en bleu) ainsi que les sites de phosphorylations principaux (en jaune). La séquence de l'alpha-synucléine est indiquée selon les même codes couleurs.

Fonction de l'alpha-synucléine en conditions physiologiques

Les rôles physiologiques de l'alpha-synucléine ne sont toujours pas entièrement élucidés. La flexibilité conformationnelle de cette protéine lui permet d'interagir avec de nombreux ligands, lui attribuant ainsi de multiples fonctions. Les rôles les plus décrits de l'alpha-synucléine sont : la régulation du trafic des vésicules synaptiques, le contrôle de la biosynthèse dopaminergique et une activité chaperon (*Villar-Piqué et al., 2016*).

La localisation pré-synaptique de cette protéine suggère un rôle en lien avec les vésicules synaptiques. En effet, l'alpha-synucléine régule le trafic vésiculaire en promouvant l'assemblage du complexe SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) via une activité chaperon (*Burré et al., 2010*). Rappelons que le complexe SNARE est responsable de la fusion membranaire. Ce complexe est donc essentiel à la libération des neurotransmetteurs lors du processus d'exocytose des vésicules synaptiques. L'alpha-synucléine lie les phospholipides par son extrémité N-terminale et la synaptobrevine par son extrémité C-terminale pour améliorer l'assemblage du complexe SNARE. Cette activité est particulièrement importante lorsque l'activité synaptique ou l'âge augmente. Au niveau pré-synaptique, l'alpha-synucléine est également impliquée dans le maintien des pools de vésicules synaptiques, la courbure de la membrane des vésicules synaptiques et le relargage des neurotransmetteurs. Ainsi, l'alpha-synucléine intervient dans la plasticité synaptique et l'apprentissage (*Burré, 2015*).

Il a été montré que l'alpha-synucléine est impliquée dans le métabolisme de la dopamine. Elle est capable d'inhiber directement la tyrosine hydroxylase, enzyme nécessaire à la transformation de la L-tyrosine en L-Dopa, précurseur de la dopamine (*Perez et al., 2002*). Cette inhibition se fait aussi de manière indirecte : l'alpha-synucléine est capable d'activer la phosphatase PP2A, ce qui va entraîner la déphosphorylation et donc l'inhibition de la tyrosine hydroxylase (*Lou et al., 2010*). Enfin, l'alpha-synucléine présente une activité de régulation négative du transporteur de la dopamine (hDAT). Elle permet ainsi de diminuer la recapture de la dopamine (*Wersinger et Sidhu, 2003*).

L'alpha-synucléine est parfois considérée comme une protéine chaperon. Effectivement, elle présente des homologies de séquence et de fonction avec les protéines chaperons 14-3-3. De plus, elle est sur-exprimée en condition de stress et prévient l'agrégation (induite par la chaleur ou chimiquement) des substrats qu'elle lie. En particulier, l'alpha-synucléine lie la PKC (Protéine Kinase C), la protéine pro-apoptotique BAD (Bcl-2-Associated Death promoter), ou la protéine ERK (Extracellular signal-regulated kinases) (*Ostrerova et al., 1999, Souza et al., 2000*). Les

domaines N-terminal et NAC de l'alpha-synucléine (résidus 1 à 95) lient les substrats protéiques alors que l'extrémité C-terminale (acides aminés 96 à 140) solubilise le complexe moléculaire (Park et al., 2002).

Bien que moins décrites, d'autres activités ont été attribuées à cette protéine. Par exemple, l'alpha synucléine nucléaire intervient dans la régulation de l'expression génique (Pinho et al., 2019). Elle a aussi avoir un rôle anti-apoptotique en régulant négativement l'expression de la protéine kinase C delta (Jin et al., 2011). Enfin, elle est capable d'interagir avec les mitochondries des neurones dopaminergiques en modulant leur potentiel membranaire, l'homéostasie calcique, le relargage des cytochrome c, la production d'ATP ainsi que les mécanismes de fusion/fission (Perez, 2020).

Les rôles de l'alpha-synucléine sont donc multiples et certains restent probablement encore inconnus. Cette protéine est primordiale bien que non essentielle puisque le triple knock-out pour l'alpha-, la bêta- et la gamma- synucléine permet la génération de souris viables et fertiles. Cependant, ces souris présentent des dysfonctionnements neuronaux importants âge-dépendants suggérant un rôle prépondérant de l'alpha-synucléine dans le maintien de l'activité cérébrale normale pendant le vieillissement. Une mort prématurée de ces souris triple-KO est d'ailleurs observée (Greten-Harrison et al., 2010). A l'inverse, la surexpression de l'alpha-synucléine entraine une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques semblable à celle observée dans la maladie de Parkinson (Mochizuki et al., 2006). Le maintien d'une quantité physiologique d'alpha-synucléine apparaît donc nécessaire afin d'éviter le développement de synucléinopathies au cours du vieillissement.

b. Dégradation

La clairance de l'alpha-synucléine peut se faire selon différents mécanismes. Nous détaillerons dans ce paragraphe les mécanismes impliqués dans la clairance de (1) l'alpha-synucléine monomérique soluble puis (2) des formes agrégées de la protéine.

La dégradation de l'alpha-synucléine est un processus essentiel car des anomalies des mécanismes de dégradation de cette protéine peuvent conduire à son accumulation et donc à

un risque élevé de développer une synucléinopathie. Différents mécanismes existent afin de dégrader l'alpha-synucléine intra-cellulaire et extra-cellulaire.

Les deux mécanismes principaux impliqués dans la dégradation intra-cellulaire des protéines endommagées ou agrégées et qui participent ainsi à la protéostase sont le système ubiquitine-protéasome (UPS) et la voie lysosomale. Le système ubiquitine-protéasome peut être décomposé en deux étapes : 1) l'ajout de plusieurs protéines d'ubiquitines à la protéine à dégrader grâce à une série de réactions enzymatiques 2) la reconnaissance et la dégradation de cette protéine poly-ubiquitinilée par le protéasome (*Stefanis et al., 2019*). Notons qu'il existe aussi un système de dégradation par le protéasome ne nécessitant pas de marquage par des ubiquitines, en particulier pour les protéines intrinsèquement désordonnées (*Tokaris et al., 2001*).

La voie lysosomale permet la dégradation intracellulaire des protéines par autophagie. Il existe trois systèmes d'autophagie : la macro autophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperons et la micro autophagie. De manière très simplifiée, les protéines à dégrader sont capturées et vont ensuite intégrer un lysosome. Le lysosome présente un pH acide et une mixture d'hydrolases acides qui vont permettre la dégradation de la protéine (*Ciechanover, 2005*).

Il existe beaucoup d'études *in cellulo* traitant de la dégradation de l'alpha-synucléine par le système ubiquitine protéasome ou la voie lysosomale. Certaines de ces études présentent des résultats contradictoires quant à l'implication du protéasome dans la dégradation de l'alpha-synucléine sauvage (*Bennett et al., 1999, Stefanis et al., 2001*). Globalement, il semblerait que le système cellulaire ainsi que la forme d'alpha-synucléine étudiés (monomères, oligomères, fibres, alpha-synucléine sauvage, alpha-synucléine mutée) influencent fortement les résultats. Par exemple, dans des cultures de cellules PC12, la forme mutée A53T de l'alpha-synucléine est à la fois dégradée par le protéasome et le lysosome alors que l'alpha-synucléine sauvage et mutée en A30P est majoritairement dégradée par le protéasome (*Webb et al., 2003*).

La clairance de l'alpha-synucléine *in cellulo* par les lysosomes a également été mise en évidence par plusieurs études (*Paxinou et al., 2001, Stefanis et al., 2019*). Cette dégradation lysosomale se fait en partie grâce aux enzymes cathépsines (D, B et L) qui engendrent des espèces tronquées en C-terminal (pour la cathépsine D), promptes à l'agrégation, avant de dégrader entièrement l'alpha-synucléine (*Sevlever et al., 2008*). Dans l'étude de Sevlever et al., la calpaïne 1 est également capable de dégrader l'alpha-synucléine *in vitro* mais n'est pas suffisante à cette clairance *in cellulo*.

In vivo, la clairance des monomères est majoritairement effectuée par le système ubiquitine protéasome. La voie lysosomale est activée uniquement en cas d'accumulation de l'alpha-synucléine, c'est à dire lorsque cette protéine est sur-exprimée (*Ebrahimi-Fakhari et al., 2011*). La voie lysosomale pourrait donc prendre le relai de la dégradation par le protéasome lorsque celui-ci est submergé. En revanche, la dégradation des espèces oligomériques et fibrillaires semble se faire plutôt via la voie lysosomale. Par exemple, des souris KO pour la protéase lysosomale cathepsine D présentent une accumulation des oligomères et des agrégats d'alpha-synucléine. Ce processus est également observé dans le cerveau de patients humains déficient en cathepsine D (*Qiao et al., 2008, Cullen et al., 2009*).

En plus de ces mécanismes de clairance intracellulaire, l'alpha-synucléine peut aussi être dégradée à l'extérieur de la cellule après son relargage. En effet, il a été montré que l'alpha-synucléine monomérique, oligomérique ou même fibrillaire peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire (*Lee et al., 2005, Emmanouilidou et al., 2011*). Ces mécanismes de sécrétions sont d'ailleurs fondamentaux dans la propagation de cellules à cellules de la pathologie. Bien que peu décrites, il existe donc des voies de dégradation de l'alpha-synucléine extracellulaire (*Stefanis et al., 2019*). L'alpha-synucléine extra-cellulaire peut-être soit (1) recaptée par des cellules (astrocytes, cellules microgliales) afin d'être dégradée soit (2) directement protéolysée par des protéases extracellulaires.

Les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales sont ainsi capables de recapter l'alpha-synucléine oligomérique ou fibrillaire extra-cellulaire afin de la dégrader par voie lysosomale. Les astrocytes et les cellules microgliales montrent une efficacité d'internalisation et de dégradation de l'alpha-synucléine plus importante que les neurones (*Lee et al., 2008, Loria et al., 2017, Tsunemi et al., 2020*). Ces résultats montrent donc un potentiel rôle protecteur des cellules gliales contre le développement de la pathologie.

Parmi les enzymes protéolytiques capables de cliver directement l'alpha-synucléine extracellulaire, on retrouve majoritairement la neurosine (KLK6). Cette enzyme est exprimée de manière prédominante dans le système nerveux central, en particulier par les oligodendrocytes (*Yamanaka et al., 1999*). La neurosine est capable de cliver l'alpha-synucléine soluble sauvage. Les formes mutées de l'alpha-synucléine, en particulier la mutation A30P ainsi que les formes phosphorylées présentent une résistance à cette dégradation (*Kasai et al., 2008*). Des metalloprotéinases de la matrice ainsi que la plasmine sont également capables de protéolyser l'alpha-synucléine monomérique ou fibrillaire extracellulaire. En particulier, la MMP3 clive l'alpha-synucléine au niveau de son extrémité C-terminale (ce qui a tendance à augmenter sa

capacité d'agrégation) alors que la plasmine protéolyse plutôt l'extrémité N-terminale (*Sung et al., 2005, Kim et al., 2012*).

Il apparait donc que la clairance de l'alpha-synucléine est due à des mécanismes multiples, complexes, dépendants de la forme (soluble, fibrillaire, sauvage, mutée, modifiée) et de la localisation (intracellulaire, ou extracellulaire) de l'alpha-synucléine. La structure des fibres d'alpha-synucléine, impliquant des différences en termes d'affinité pour des partenaires d'interactions, pourrait également influencer les mécanismes impliqués dans leur dégradation. Également, les cellules gliales, en plus des neurones, ont un rôle prépondérant dans cette clairance. Le déséquilibre de la balance homéostatique entre la production, l'agrégation et la dégradation de l'alpha-synucléine joue un rôle crucial dans le développement de la pathologie. Ces mécanismes de clairance représentent donc des cibles thérapeutiques potentielles intéressantes.

c. Agrégation pathologique

Comme nous l'avons dit précédemment, l'alpha-synucléine ne présente pas de structure tridimensionnelle stable en condition physiologique. Notons que cela ne signifie pas que cette protéine n'a pas de structure mais plus probablement qu'elle est capable d'emprunter un grand nombre de structures différentes en équilibre dynamique. L'environnement cellulaire comme la présence de partenaires d'interactions va également influencer le repliement de la protéine. L'existence de ces multiples conformations est largement préservée dans les cellules de mammifères (*Theillet et al., 2016*). Pourtant en condition pathologique cette protéine peut emprunter une structure riche en feuillets bêta, persistante, qui favorise son agrégation (*Rodriguez et al., 2015*). Habituellement, lorsqu'une protéine se replie de manière anormale, plusieurs phénomènes peuvent se dérouler. Si cette structure n'est pas stable, elle ne sera que transitoire et la protéine adoptera rapidement une nouvelle conformation plus stable. Si cette structure est stable et persiste, la protéine sera prise en charge par des protéines dites chaperons qui modifieront cette conformation anormale. Les protéines mal conformées présentent généralement des surfaces hydrophobes, habituellement retrouvées au cœur de la protéine. Les chaperons vont masquer ces surfaces et, grâce à leur flexibilité, modifier leur structure en redirigeant les régions hydrophiles à l'extérieur de la protéine. Si la protéine

persiste dans cet état mal replié, elle sera dégradée par le système ubiquitine protéasome (*Ellis, 1987*).

Pourtant, chez les patients atteints de synucléinopathies on observe une persistance des formes anormales de l'alpha-synucléine qui s'assemblent en fibres pathologiques (*Rodriguez et al., 2015*). Il y a donc une anomalie dans la prise en charge de l'alpha-synucléine anormalement repliée chez ces patients. En effet, la quantité d'alpha-synucléine agrégée dans le cerveau va dépendre de la balance entre trois phénomènes : la synthèse, la clairance et l'agrégation de cette protéine. Un déséquilibre de cette balance comme par exemple la multiplication du gène SNCA, la défaillance du protéasome ou encore une augmentation du stress oxydant altère la quantité d'alpha-synucléine cérébrale et promeut la formation et l'accumulation d'espèces toxiques. Le système est en quelque sorte « surchargé ». Les formes anormales de l'alpha-synucléine vont pouvoir s'accumuler, s'agréger et ainsi gagner en stabilité (*De Mattos et al., 2020*).

En effet, l'alpha-synucléine anormalement repliée expose à sa surface des régions hydrophobes, habituellement enfouies. Ces surfaces hydrophobes exposées ont tendance à s'agréger afin de diminuer au maximum leurs interactions avec le milieu aqueux. L'alpha-synucléine mal conformée fonctionne donc à la manière d'une amorce afin de recruter d'autres monomères.

Selon l'hypothèse Prion, cette amorce pourrait convertir l'alpha-synucléine monomérique native en protéine mal-conformée pour permettre son agrégation grâce à l'intervention d'une autre protéine hypothétique dite « protéine X » (*Cohen and Prusiner, 1998*). Cependant, à cause de la forte flexibilité de l'alpha-synucléine, celle-ci présente un grand nombre de repliements transitoires plus ou moins stables. Il est bien plus probable que l'amorce soit capable de bloquer les monomères d'alpha-synucléine dans un repliement particulier avant de les recruter comme décrit dans la figure 6 (*Brundin et al., 2010, Melki 2018*). A chaque ajout d'un nouveau monomère, la stabilité de la fibre en formation va augmenter. La croissance de cette fibre est potentiellement illimitée car l'addition d'un monomère entraîne la formation d'un nouveau site de liaison pour l'ajout d'une autre unité. La fibre va parfois se fragmenter, générant alors de nouveaux sites potentiels d'addition de monomères et de nouvelles fibres.

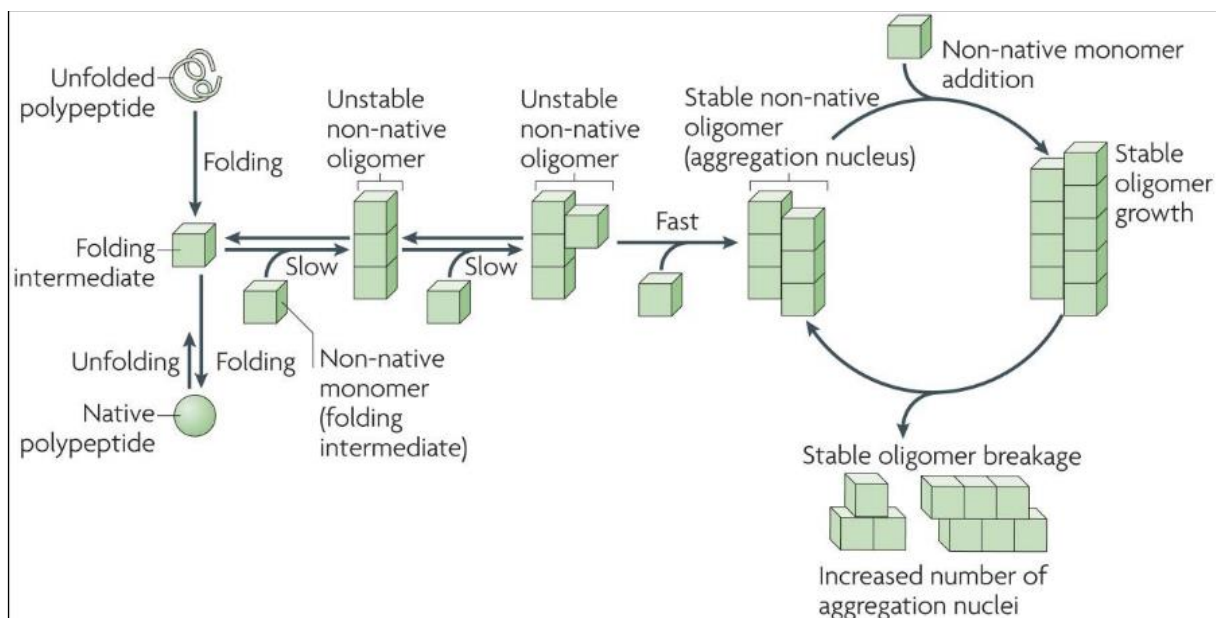


Figure 6: Agrégation de l'alpha-synucléine

Issue de Brundin P., Melki R., et Kopito R., (2010), Modélisation de l'agrégation réversible des monomères d'alpha-synucléine sous forme d'oligomères puis irréversible sous forme de fibres.

Les premières étapes menant à la formation d'oligomères sont longues et réversibles car thermodynamiquement défavorables. Lorsque les interactions intermoléculaires sont suffisantes, la polymérisation en fibres amyloïdes devient irréversible. Ces fibres présentent alors une forte résistance à la clairance par la machinerie cellulaire (Brundin et al., 2010, Oosawa et Asakura, 1975).

La formation d'agrégats d'alpha-synucléine entraîne une toxicité cellulaire (Alam et al., 2019). En effet, ces agrégats sont tout d'abord capable de piéger d'autres macromolécules (protéines, lipides) et ainsi d'empêcher leur fonctionnement normal. De plus, ces agrégats perturbent l'homéostasie cellulaire ionique et la protéostase cellulaire. Également, les fibres d'alpha-synucléine sont capables de compromettre l'intégrité et la fonction des organelles cellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries, lysosomes) (Flavin et al., 2017). Enfin, ces assemblages fibrillaires promeuvent la dégénérescence en entraînant une inflammation chronique (Gustot et al., 2015). Notons que la toxicité des agrégats et les mécanismes impliqués seront également dépendants de leur structure. En effet, des structures différentes impliquent des surfaces et des interactions différentes avec les macromolécules ou les organelles environnants et donc une toxicité structure-dépendante.

En conclusion, malgré la flexibilité de l'alpha-synucléine, cette protéine peut se retrouver « bloquée » dans une conformation anormale et agir à la manière d'une amorce pour s'allonger sous la forme d'une fibre de plus en plus stable. La présence de ces agrégats va entraîner différentes conséquences délétères et une neurodégénérescence progressive. De récentes études tendent à prouver que la structure des agrégats conditionne leur toxicité et donc la pathologie qui en découle (Peelaerts et al., 2018, Van der Perren et al., 2020).

d. Propagation

Les inclusions observées dans le cerveau des patients atteints de synucléinopathies apparaissent selon un schéma spatial caractéristique en fonction du stade de développement de la maladie (Braak et al., 2003). Il a été proposé que les agrégats d'alpha-synucléine puissent se propager de cellule à cellule vers ces différentes régions cérébrales (« spreading »). Lorsque des fibres d'alpha-synucléine sont internalisées par un neurone, elles sont capables de recruter l'alpha-synucléine endogène afin de s'allonger/ se fragmenter/ former de nouvelles fibres (« seeding »).

Un premier argument en faveur de cette hypothèse est que, chez des patients parkinsoniens à qui l'on a greffé des neurones embryonnaires sains, des agrégats d'alpha-synucléine sont retrouvés dans ces mêmes neurones une dizaine d'années plus tard (Li et al., 2008). Cette observation suggère un phénomène de propagation de la pathologie des neurones affectés vers les neurones sains. Différents modèles cellulaires et animaux ont ensuite essayé de reproduire et confirmer ce phénomène de seeding/spreading (Hansen et al., 2011, Volpicelli-Daley et al., 2014, Rey et al., 2019, Chung et al., 2019). L'utilisation d'un dispositif micro fluidique permettant la culture de neurones dans deux chambres micro fluidiques distinctes, uniquement reliées par les axones des neurones, a montré le transport antérograde et rétrograde de l'alpha-synucléine (= spreading) (Freundt et al., 2012, Brahic et al., 2016). Également, la culture de cellules souches neuronales de cortex de souris exprimant de l'alpha-synucléine fluorescente rouge exposées à de l'alpha-synucléine humaine marquée par la GFP (Green Fluorescent Protein) permet l'observation d'agrégats d'alpha-synucléine marquées par les deux fluorophores (Desplats et al., 2009). L'utilisation de technique de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) permettant de mesurer des interactions

moléculaires a également permis d'étudier ce processus de seeding de l'alpha-synucléine. On observe un phénomène de seeding à la fois de l'alpha-synucléine recombinante agrégée *in vitro* et de l'alpha-synucléine agrégée issue du cerveau de patients atteints de synucléinopathies (Yamasaki *et al.*, 2019). Ces résultats indiquent que l'alpha-synucléine internalisée agit à la manière d'une amorce et recrute l'alpha-synucléine endogène afin de former de nouveaux agrégats (= seeding)

Pour que ce phénomène de propagation pathologique puisse exister, les agrégats d'alpha-synucléine doivent sortir de la cellule où ils sont produits, entrer dans la cellule réceptrice et recruter l'alpha-synucléine endogène (figure 7).

Les cellules sont capables de libérer des agrégats d'alpha-synucléine grâce à des mécanismes d'exocytose. Notamment, des voies d'exocytoses peu conventionnelles, indépendantes du réticulum endoplasmique/ appareil de Golgi permettent ce transport (Lee *et al.*, 2005). Les fibres d'alpha-synucléine peuvent aussi être sécrétées par les axones après un transport antérograde (Brahic *et al.*, 2016). Le transfert de la pathologie d'un neurone à l'autre par des nanotubes (prolongements cellulaires composés de filaments d'actine et de structures membranaires connectant des cellules entre-elles) a également été décrit (Abounit *et al.*, 2016). Les agrégats peuvent également être libérés à la suite de la lyse de la cellule consécutive à la toxicité des agrégats, notamment via la perméabilisation de la membrane plasmique (Milanesi *et al.*, 2012).

A la suite de cet export dans le milieu extracellulaire, les agrégats d'alpha-synucléine peuvent se lier et être internalisés par de nouvelles cellules (neurones et cellules gliales). Différents mécanismes sont impliqués dans ce phénomène, l'endocytose apparait comme le mécanisme majoritaire. En effet, l'inhibition de l'endocytose dynamine/ clathrine-dépendante dans des cultures cellulaires de neurones entraine une réduction drastique de l'internalisation des oligomères et des fibres d'alpha-synucléine mais pas des monomères. Les formes monomériques de l'alpha-synucléine diffusent passivement à travers la membrane plasmique (Lee *et al.*, 2008). L'endocytose des fibres d'alpha-synucléine par les neurones et les oligodendrocytes peut se faire grâce à leur liaison aux héparanes sulfates des protéoglycanes présents à la surface. Cependant, il semble que l'endocytose par les astrocytes et la microglie se fasse selon d'autres mécanismes (Holmes *et al.*, 2013, Ihse *et al.*, 2017). Il a été mis en évidence que les fibres d'alpha-synucléine lient également d'autres protéines membranaires comme LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3), la sous-unité alpha 3 de l'ATPase Na⁺/K⁺ ou les neurexines (Shrivastava *et al.*, 2015, Mao *et al.*, 2016). Notons qu'en fonction de l'état

(oligomérique ou fibrillaire), de la structure (ou souche) des agrégats d'alpha-synucléine ou encore du type cellulaire étudié, les propriétés d'internalisation seront différentes.

A la suite de leur internalisation, les fibres et les oligomères d'alpha-synucléine empruntent la voie lysosomale pour être dégradés. Cependant, il a été montré que les fibres sont capables d'entraîner la rupture de la membrane des lysosomes, échappant ainsi aux mécanismes de dégradation. Ce phénomène entraîne par la même une augmentation des espèces réactives de l'oxygène par un mécanisme cathépsine B dépendant (*Freeman et al., 2013*).

a. Les maladies à Prions

Aucun agent infectieux conventionnel tel qu'une bactérie, un virus ou un parasite n'a été identifié comme étant à l'origine des synucléinopathies. L'ensemble des connaissances que nous avons de ces maladies tendent à montrer que c'est la présence d'alpha-synucléine, une protéine endogène, anormalement agrégée, qui en est la cause. Les premières maladies liées à la présence d'une protéine mal conformée et entraînant une neurodégénérescence du système nerveux central à avoir été décrites sont les encéphalopathies spongiformes transmissibles appelées aussi maladies à Prion. Nous allons ici décrire ces pathologies dites « à Prion » et analyser les points communs entre les maladies à Prions et les synucléinopathies.

Les maladies à Prion correspondent chez l'Homme à la maladie de Creutzfeldt Jakob, au syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, à la maladie du Kuru et à l'Insomnie Fatale Familiale. Elles englobent également la maladie de la vache folle ou encore la tremblante du mouton chez les mammifères animaux. Toutes ces pathologies sont caractérisées par la présence dans le cerveau d'agrégats, en partie composés de la protéine PrPsc (Prion Scrapie), entraînant une neurodégénérescence.

A la différence des synucléinopathies, une des particularités de ces maladies à Prion mise en évidence par plusieurs drames sanitaires est leur caractère transmissible.

Parmi les drames sanitaires liés aux maladies à Prion, nous pouvons citer la maladie du Kuru. Entre les années 1920 et 1950, la maladie du Kuru a décimé une tribu de Papouasie-Nouvelle-Guinée qui avait des rites funéraires cannibales. En particulier les femmes et les enfants mangeaient le système nerveux central de leurs morts. De cette manière, ils se sont transmis

cette maladie neurodégénérative. Près de la moitié de la tribu a succombé de cette maladie (*Liberski et al., 2019*).

Une autre affaire sanitaire est celle des hormones de croissance. Entre 1982 et 1986, des centaines d'enfants atteints de nanisme ont été traités en France avec des hormones de croissance issues de la purification d'hypophyse contaminées prélevées sur des cadavres. 111 d'entre eux sont décédés plusieurs années plus tard de la maladie de Creutzfeldt-Jakob transmise par les extraits d'hypophyse injectés (*Brown et al., 2012*).

Enfin, le scandale de la vache folle a montré que ce type de maladie pouvait se transmettre d'une espèce à l'autre. En effet, entre les années 1986 et 2000, une épidémie touche les bovins d'élevage au Royaume-Uni. La maladie, analogue à la tremblante du mouton, entraîne une dégénérescence de leur système nerveux. La maladie de la vache folle s'est déclarée à la suite de l'utilisation de farines animales contaminées pour nourrir ces bêtes. 223 personnes ayant consommé la viande issue de ces bovins auraient été affectées par une variante de la maladie de Creutzfeld-Jacob transmise du bovin à l'Homme (*Brown, 2001*).

Tous ces drames sanitaires ont démontré que les maladies à Prion pouvaient se transmettre soit d'une personne à l'autre (suite à la consommation ou à l'injection de tissus contaminés) soit même d'une espèce à l'autre.

C'est en 1982 que Stanley Prusiner propose avec beaucoup de précaution que la tremblante du mouton, et par extension la maladie de Creutzfeldt-Jacob et la maladie du Kuru, soient liées à l'agrégation et à la propagation d'une protéine (*Prusiner, 1982*):

« Une explication alternative (et attractive) pour l'apparent manque d'immunogénicité de l'agent scrapie est la possibilité que cet agent soit étroitement lié à une protéine cellulaire normale contre laquelle l'hôte ne produit pas d'anticorps », *S. Prusiner*.

Bien que dénué d'acides nucléiques, cet agent infectieux apparaît transmissible, d'où le terme Prion pour « proteinaceous infectious particle » (*Prusiner, 1982*). Si cet agent ne présente pas d'acides nucléiques, la question de son mécanisme de réplication apparaît alors tout à fait énigmatique. S. Prusiner avance alors l'hypothèse que l'information nécessaire à la réplication de cet agent soit contenue dans la cellule hôte et que les gènes codant pour cet agent permettent également la production de protéines essentielles en conditions normales. En conclusion de cette réflexion, S. Prusiner évoque l'idée que d'autres pathologies comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson soient liées à un agent Prion.

Cette hypothèse a été accueillie avec une très forte hostilité par la communauté scientifique. Cependant, S. Prusiner identifie quelques années plus tard la protéine impliquée dans ces maladies : la PrP-sc pour prion scrapie. Il montre que cette protéine est également présente chez les patients sains, mais sous une autre forme, c'est la PrP-c pour prion cellulaire (*Westaway et Prusiner, 1986, Stahl et al., 1993*). S. Prusiner reçoit en 1997 le prix Nobel de physiologie ou médecine pour ses travaux sur l'encéphalopathie spongiforme bovine et la découverte des prions.

Un très large débat anime la communauté scientifique depuis plusieurs années afin de déterminer si les synucléinopathies et d'autres maladies neurodégénératives sont ou non des maladies à Prion. Globalement, des arguments favorables à cette hypothèse sont que ces maladies sont liées à l'accumulation d'une protéine endogène anormalement repliée et présentent des mécanismes communs à ceux des maladies à Prion. En revanche, un argument contre cette hypothèse est que le caractère infectieux des maladies à Prion n'a (heureusement) pas été démontré pour ces autres maladies neurodégénératives. Nous considérerons ici que les synucléinopathies sont des maladies qui ressemblent aux maladies à Prion (« Prion-like »). Ce postulat nous permet de faire certaines analogies entre les synucléinopathies et les maladies à Prion sans pour autant considérer que ces deux groupes de maladie aient des mécanismes d'action strictement identiques.

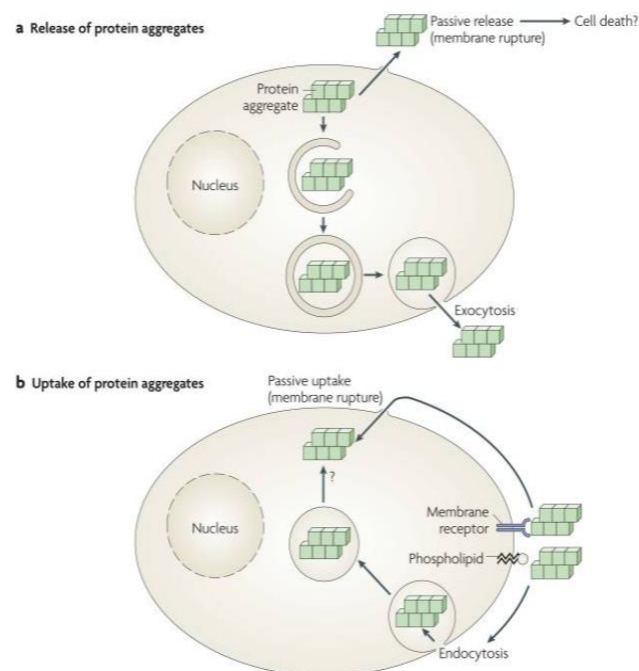


Figure 7: Propagation de l'alpha-synucléine

Modifiée de Brundin P., Melki R., et Kopito R., (2010), Mécanismes impliqués dans le relargage des agrégats d'alpha-synucléine (a) et leur internalisation par les cellules (b).

Les mécanismes de propagation des agrégats de cellule à cellule et de recrutement de l'alpha-synucléine endogène (spreading/ seeding) sont donc centraux dans l'évolution des synucléinopathies au cours du temps. Ces mécanismes sont en partie dépendants de la structure des agrégats. En effet, la surface des agrégats entraînant un interactome spécifique permettra ou non la liaison à différents récepteurs membranaires. Il a été montré par exemple que la surface des agrégats d'alpha-synucléine influence leurs capacités d'internalisation en termes d'efficacité ainsi qu'en terme de type cellulaire affecté (Peelaerts et al., 2015, Shrivastava et al., 2020).

e. Formes modifiées

Enfin, une particularité de l'alpha-synucléine est qu'elle peut présenter différentes modifications post traductionnelles. Certaines de ces modifications sont physiologiquement présentes et d'autres apparaissent spécifiquement dans un contexte pathologique.

Par l'exemple, 90% de l'alpha-synucléine présente dans les corps de Lewy est phosphorylée au niveau de sa serine 129 contre 4% en condition normale. Cette phosphorylation est aujourd'hui considérée comme une caractéristique des synucléinopathies (Fujiwara et al., 2002). Notons cependant que d'autres études effectuées par spectrométrie de masse chez des patients atteints de la maladie de Parkinson ne montrent pas des proportions d'alpha-synucléine phosphorylée sur la serine 129 aussi importante (Kellie et al., 2014). Cette modification est effectuée par plusieurs kinase comme la CK2 (casein kinase 2, Ishii et al., 2007), la PLK1,2 et 3 (polo-like kinase, Mbefo et al., 2010), ou la GRK2 (G protein-coupled receptor kinases, Pronin et al., 2000). *In vitro*, la phosphorylation de l'alpha-synucléine sur sa serine 129 promeut son agrégation. Également, cette modification augmente la rupture de la membrane des vésicules contenant des fibres d'alpha-synucléine permettant ainsi leur accès au cytosol (Samuel et al., 2016). Cette phosphorylation semble donc avoir un rôle dans le développement de la

pathologie. D'autres site de phosphorylation de l'extrémité C-terminale de l'alpha-synucléine (tyrosine 125, 133 et 136) ont également été mis en évidence.

Des formes tronquées de l'alpha-synucléine sont aussi observées dans les corps de Lewy (environ 15%) (*Baba et al., 1998*). Les troncatures sont majoritairement localisées au niveau de l'extrémité C-terminale de l'alpha-synucléine (après les acides aminés 115, 119, 122, 124, 125, 129, 133) (*Anderson et al., 2006*) mais certaines sont également retrouvées à l'extrémité N-terminale (après les acides aminés 10, 12, 21) (*Kellie et al., 2014, Pieri et al, 2015*). Différentes études *in vitro* et *in vivo* montrent que les formes tronquées en C-terminal sont plus promptes à l'agrégation que la protéine entière. En effet, les charges négatives de la région C-terminale pourraient en partie prévenir l'agrégation de la région NAC (*Murray et al., 2003*). Les enzymes impliquées dans ces troncatures sont la calpaïne, la cathepsine D, la neurosine, la caspase 1 et la metalloproteinase 3 (*Sevlever et al., 2008*). Ces formes tronquées pourraient être issues d'une dégradation incomplète de l'alpha-synucléine.

Enfin, d'autres modifications comme l'ubiquitination, la sumoylation, la nitration, la O-glcNacylation de l'alpha-synucléine peuvent également être retrouvées.

Encore une fois, la structure des agrégats d'alpha-synucléine a une influence sur leurs modifications. En particulier, les troncatures de l'alpha-synucléine qui se déroulent postérieurement à sa polymérisation en fibres ne pourra s'effectuer que sur des régions en surface des agrégats qui seront suffisamment accessibles aux protéases. Il est également envisageable que les modifications de l'alpha-synucléine monomérique avant son assemblage en fibres (par exemple la phosphorylation) entraînent des contraintes physico-chimiques (de type encombrement stérique, répulsions ou attraction de charges etc.) influençant la structure des agrégats.

En conclusion, l'alpha-synucléine joue un rôle central dans les synucléinopathies. Des pertes de fonctions physiologiques combinées à des gains de fonctions toxiques permettent l'installation d'une neurodégénérescence complexe dont nous ne comprenons pas encore tous les mécanismes. L'alpha-synucléine agrégée s'avère cependant être une cible thérapeutique à privilégier pour le développement de traitements permettant le ralentissement et/ou l'arrêt de la propagation de la maladie.

3. Synucléinopathies et mécanisme « prion-like »

b. Caractéristiques communes entre l'alpha-synucléine et la protéine PrP

Comme l'alpha-synucléine, la protéine PrP-c est une protéine endogène majoritairement exprimée dans le système nerveux central.

Après maturation, la PrP-c présente 209 acides-aminés et une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). L'ancre GPI permet à la PrP-c d'être reliée à la membrane des cellules, le reste de la protéine étant exposé à l'extérieur de la cellule. La PrP-c présente deux domaines majeurs : une région C-terminale structurée par trois hélices alpha et un court feuillet bêta à double brin, ainsi qu'une région N-terminale intrinsèquement désordonnée. Cette protéine est impliquée dans la survie cellulaire et l'adhérence cellulaire. On observe une forte homologie dans la séquence et dans l'organisation générale des différentes protéines PrP-c des mammifères (*Liautard et al., 2002*).

Comme l'alpha-synucléine, la PrP-c adopte en condition pathologique un repliement anormal (PrP-sc). Une partie des hélices alpha et du corps de la protéine sont convertis en feuillets bêta. Des études de dichroïsme circulaire montrent que la protéine PrP-c est composée de 40% d'hélice alpha et d'une faible proportion de feuillets bêta (< 5%). La protéine PrP-sc est constituée, elle, de 30% d'hélice alpha et 43% de feuillets bêta (*Liautard et al., 2002*). La PrP-c et la PrP-sc présentent donc une structure différente alors qu'elles ont une séquence primaire identique. La forme enrichie en feuillet bêta de la PrP-sc est prompte à l'agrégation.

Comme l'alpha-synucléine, la PrP-sc s'assemble sous forme de fibres pathogènes insolubles et résistantes à la protéolyse qui vont s'accumuler dans les neurones et entraîner une neurodégénérescence. Cette protéine agit également à la manière d'une amorce pour recruter la PrP présente dans les cellules et propager sa structure en feuillets bêta (*Saborio et al., 2001*). Cela implique que la présence de la PrP endogène est essentielle au développement de la pathologie. En effet, les souris KO pour la PrP sont résistantes à une infection par la PrP-sc (*Sailer et al., 1994*). Enfin, comme l'alpha-synucléine, la PrP-sc se propage de cellule à cellule afin d'envahir l'ensemble du cerveau (*Solassol et al., 2003*).

Il apparaît donc que l'alpha-synucléine et la protéine PrP présentent, en condition pathologique, beaucoup de mécanismes d'actions communs. D'un point de vue moléculaire, le développement des maladies à Prion ressemble au développement des synucléinopathies. C'est pourquoi une partie de la communauté scientifique fait l'hypothèse que les synucléinopathies sont des maladies « à Prion » et que l'alpha-synucléine, en condition pathologiques, a les mêmes caractéristiques que la protéine Prion-sc (Steiner et al., 2018).

c. Notion de souches du Prion

Une des questions fondamentales des maladies à Prion est : comment l'agrégation d'une même protéine peut mener à plusieurs maladies ? En effet, les temps d'incubations et les régions cérébrales atteintes varient notablement en fonction de la maladie à Prion considérée (Baïardi et al., 2019). Une réponse avancée est que la protéine PrP puisse emprunter et transmettre plusieurs conformations pathologiques en fonction de son environnement menant à des fibres structurellement différentes. C'est le concept de souche du prion (Chien et al., 2004). Les différences de structure et de surface des fibres prions entraînent des différences de partenaires de liaison, de capacité d'internalisation, de toxicité et donc une variété de pathologie. Très schématiquement la PrP peut s'agréger en différentes souches ayant des propriétés structurelles et fonctionnelles uniques entraînant ainsi différentes maladies. Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous allons retracer l'historique des connaissances liées à cette notion de souche.

Dès les années 1970, il est observé que l'inoculation intracérébrale de différents sérums contenant l'agent prion « scrapie » à des souris entraîne des pathologies avec des temps d'incubation souche-spécifiques. Par exemple, la figure 8 (Hecker et al., 1992) montre très clairement que l'inoculation dans le cerveau de souris de deux souches différentes de prion issues de hamsters malades entraîne l'apparition de la pathologie à des temps différents et de manière souche-spécifique (entre 63 et 82 jours après injection pour la souche Sc237 et entre 95 et 130 jours post injection pour la souche 139H). De plus, on observe par histologie que ces deux souches n'ont pas la même vitesse de propagation dans le cerveau et n'affectent pas les mêmes structures cérébrales (bien qu'elles présentent la même composition moléculaire). De manière intéressante, les caractéristiques de ces souches sont maintenues après plusieurs passages successifs dans des modèles animaux.

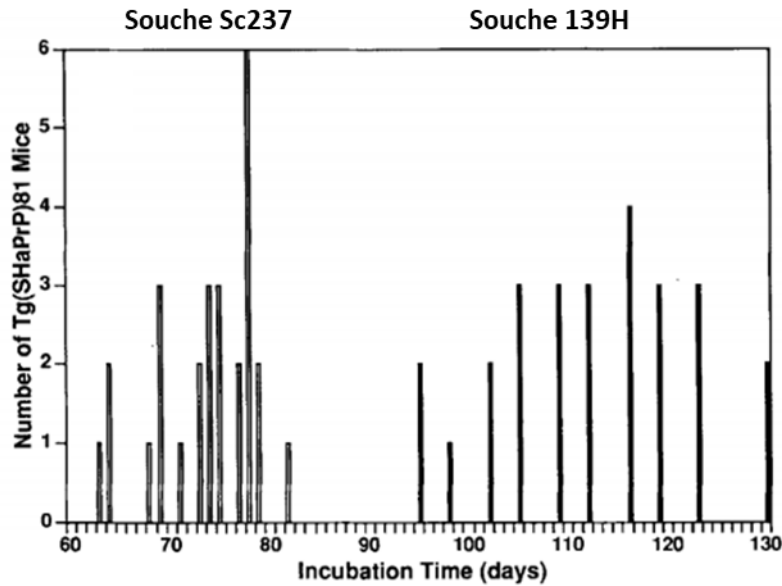


Figure 8: Durée d'incubation de deux souches de l'agent prion

Modifiée de Hecker et al., 1992, Délais d'incubation de la pathologie prion chez des souris transgéniques SHaPrP7 inoculées avec la souche prion Sc237 (bâtons ouverts, groupement de gauche) ou la souche prion 139H (bâtons fermés, groupement de droite) avant le développement des premiers symptômes d'ataxie et de bradykinésie.

Une souche peut être caractérisée par le fait que :

- 1) Dans une espèce donnée, le temps d'incubation entre l'infection initiale et l'apparition des symptômes cliniques est fortement reproductible et dépendant de la quantité d'agent infectieux injecté.
- 2) La sévérité et la distribution cérébrale des lésions dépendent de la souche injectée et sont hautement reproductibles, indépendamment de la quantité d'agent infectieux injecté (Bruce, 1993).

Le phénomène de souche du prion est également observé chez l'Homme. En effet, le profil protéolytique obtenu après digestion par la protéinase K des agrégats de PrP-sc issues de cerveaux de patients atteints du syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) diffère de celui observé chez les patients atteints de la maladie de Creutzfeldt Jakob (figure 9). Ce résultat indique que les régions de la protéine exposées au solvant ne sont pas les mêmes dans ces maladies et donc que la structure des agrégats est différente. Cette différence aurait pu

s'expliquer par le fait que les patients atteints de GSS présentent une mutation (P102L) du gène codant pour la protéine PrP. Cependant, on observe également une hétérogénéité de ce profil protéolytique entre différents patients atteints de GSS et présentant tous cette même mutation (figure 9). Ces résultats suggèrent donc également qu'il existe plusieurs types de GSS différents. De plus, les patients présentant un même profil protéolytique présentent un tableau clinique similaire. Il existe donc une corrélation entre le profil protéolytique lié à la structure du Prion et les caractéristiques pathologiques. L'existence des souches de prion, différenciables par leur repliement, conditionne la pathologie (*Parchi et al., 1998*).

Les recherches actuelles tendent à montrer que ce phénomène de souche existe également dans les synucléinopathies, expliquant de cette manière, au moins en partie, la variété des synucléinopathies (Bousset et al., 2013, Peelaerts et al., 2015).

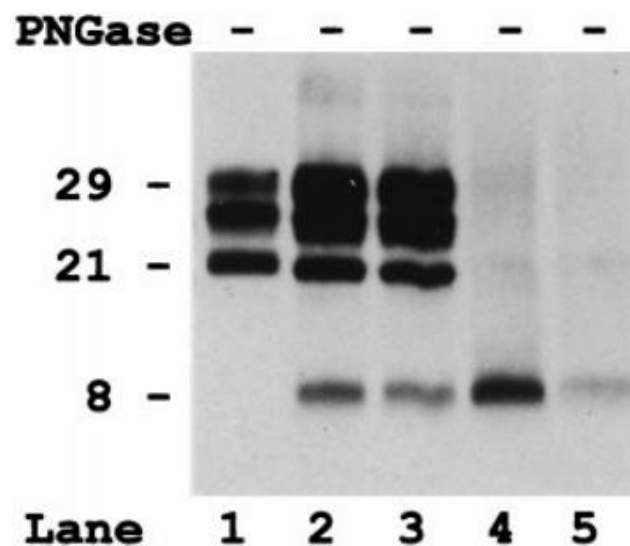


Figure 9: Profils protéolytiques d'agrégats de PrP-sc issus de patients

Issue de Parchi et al., 1998, Immunoblot des fragments de PrP-sc issus du cerveau de patients atteints de CJD (lane 1) ou de GSS (lane 2 à 5) résistants à la protéolyse par la protéinase K.

d. Les souches d'alpha-synucléine

Comme nous l'avons décrit précédemment, les synucléinopathies présentent beaucoup de caractéristiques communes avec les maladies à Prion. L'existence de souches d'alpha-synucléine a également été mise en évidence.

In vitro, il est possible d'agréger l'alpha-synucléine humaine recombinante selon différentes structures. Notre équipe a pu agréger *in vitro* deux types de souches pures appelées fibres et rubans en utilisant des tampons d'agrégation différents. Ces souches présentent une structure différente qui a été caractérisée par microscopie électronique, profil protéolytique après digestion par la protéinase K et RMN (résonance magnétique nucléaire) comme décrit dans la figure 10 (Bousset *et al.*, 2013). On observe ici très clairement que ces deux souches forment des agrégats fibrillaires qui présentent des structures différentes.

Plusieurs autres souches comme les fibres 91 (agrégées dans un tampon à pH 9.1), les fibres 65 (agrégées dans un tampon à pH 6.5) ou les fibres 110 (tronquées après l'acide aminé 110) ont également été caractérisées par notre équipe (Verasdonck *et al.*, 2016, Shrivastava *et al.*, 2020).

Ces souches présentent des caractéristiques différentes. Par exemple, leur liaison à la membrane de neurones primaires est souche-spécifique. En effet, les fibres 91 montrent une liaison à la membrane des neurones significativement supérieur à celle des rubans, elle-même supérieur à celle des fibres. Les fibres 65 et les fibres 110 présentent, elles, une liaison à la membrane des neurones primaires significativement inférieure à celle des fibres (Shrivastava *et al.*, 2020). L'injection de ces 5 souches (fibres, rubans, fibres 91, fibres 65 et fibres 110) dans le bulbe olfactif de souris montre qu'elles se propagent également dans le cerveau selon des distributions spatiales souche-spécifique (Rey *et al.*, 2019).

In vivo, l'injection de fibres et de rubans dans le cerveau de rats entraîne aussi des différences au niveau des types cellulaires affectés. En effet, les rats sur-exprimant de l'alpha-synucléine humaine et injectés par les fibres présentent des inclusions uniquement neuronales alors que les rats sur-exprimant l'alpha-synucléine humaine injectés par les rubans présentent des inclusions dans les neurones et les oligodendrocytes. Rappelons que la présence d'agrégats d'alpha-synucléine dans les oligodendrocytes est caractéristique de l'atrophie multi systématisée. De plus, l'injection de fibres dans ces animaux provoque des symptômes moteurs significativement plus importants en comparaison des rats injectés avec des rubans (Peelaerts *et al.*, 2015). Récemment, une autre équipe a pu montrer en injectant d'autres types de

polymorphes d'alpha-synucléine recombinants agrégés *in vitro* ou issus du cerveau de patients à des souris transgéniques que celles-ci développaient des pathologies souches-spécifiques. En particulier, ils observent des différences en termes de temps d'incubation, de régions cérébrales touchées, de type cellulaire affecté et de morphologie des agrégats en fonction de la souche injectée (Lau et al., 2020).

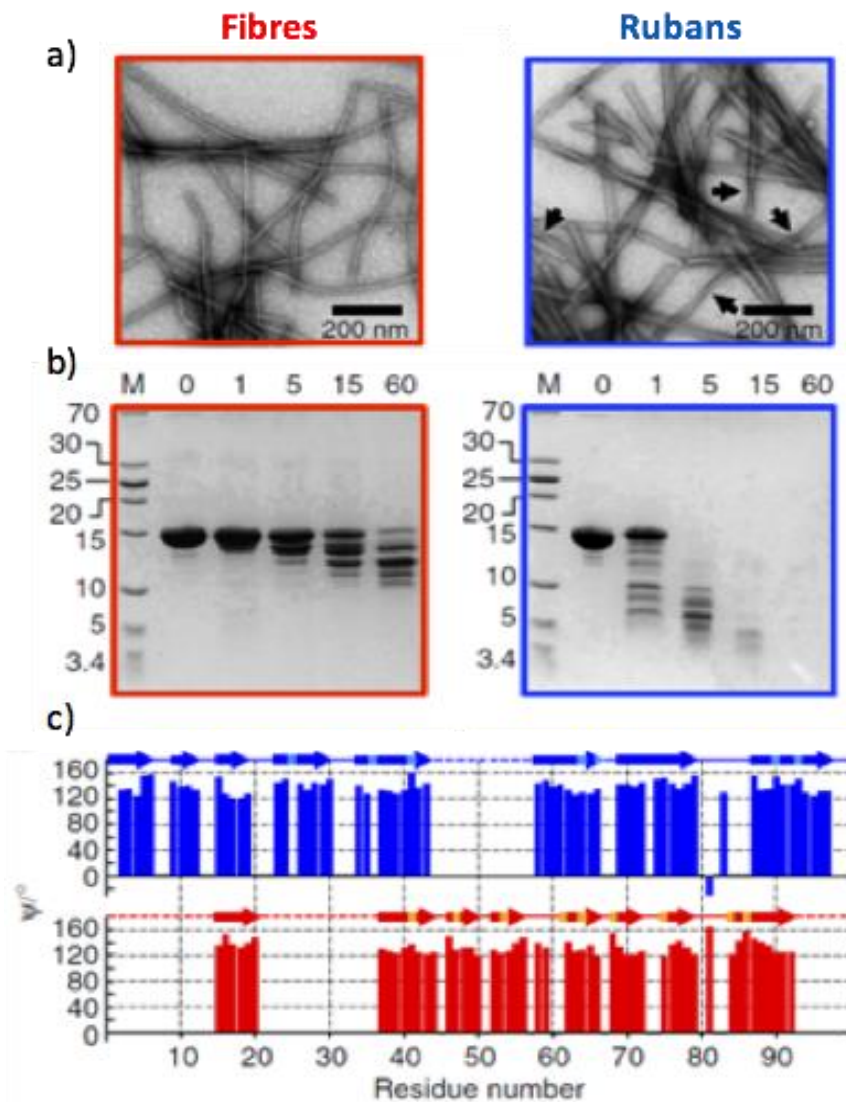


Figure 10: Caractérisation de deux souches d'alpha-synucléine

Modifiée de Bousset et al., 2013. Caractérisation de la structure des fibres et des rubans d'alpha-synucléine, a) par microscopie électronique, b) par SDS-PAGE après la protéolyse ménagée des souches par la protéinase K, etc) par analyse RMN. Les résultats obtenus avec les fibres sont

encadrés en rouge et les résultats obtenus avec les rubans sont encadrés en bleu, des fibres (en rouge) et des rubans (en bleu) d'alpha synucléine.

L'existence de souches d'alpha-synucléine conditionnant la pathologie a été observé chez l'Homme. Plusieurs études montrent que des agrégats d'alpha-synucléine issus du liquide céphalo-rachidien ou des inclusions cérébrales de patients atteints de différentes synucléinopathies présentent des structures différentes (notamment définies par profil protéolytique après digestion par la protéinase K) (*Spillantini et al., 1998, Peng et al., 2018, Shahnawaz et al., 2020*). Également, l'alpha-synucléine extraite des corps de Lewy de patients atteints de démences à corps de Lewy présente un taux de phosphorylation sur la sérine 129 significativement supérieur au taux retrouvé dans les inclusions cytoplasmiques gliales de patients atteints d'atrophie multi-systématisée.

Ces différences de structures entraînent des différences fonctionnelles. En effet, des cultures cellulaires de neurones ou d'oligodendrocytes exposés aux agrégats d'alpha-synucléine issus d'inclusions cytoplasmiques gliales de patients atteints d'AMS développent beaucoup plus d'inclusions d'alpha-synucléine que ceux exposés à la même quantité d'agrégats d'alpha-synucléine issues de corps de Lewy de patients atteints de DLB. De la même manière, l'injection de ces deux types d'agrégats dans le cerveau de souris sauvages entraîne une propagation avec des distributions spatiales différentes (*Peng et al., 2018*).

Le développement de la technique de PMCA (protein misfolding cyclic amplification) pour les agrégats d'alpha-synucléine permettant leur amplification à partir d'extrait de cerveau ou encore à partir de biopsies gastro-intestinales de patients (*Fenyl et al., 2019*) a été fondamental pour l'étude de la structure des souches d'alpha-synucléine chez l'homme (*Van der Perren et al., 2020, Strohäker et al., 2019*). En effet, cette technique est basée sur la capacité des agrégats fibrillaires pathogènes d'alpha-synucléine présents dans le cerveau des patients de recruter la protéine endogène afin de s'allonger. Il est ainsi possible d'amplifier ces agrégats en conservant leur structure afin d'obtenir des quantités plus importantes de souches pures d'alpha-synucléines présentes dans le cerveau des patients, nécessaire aux analyses biochimiques. Une récente étude basée en partie sur la PMCA, en collaboration avec notre équipe, montre des différences importantes de la surface des agrégats issus de patients atteints de la maladie de Parkinson et de patients atteints de démences à corps de Lewy. En revanche, l'analyse de la surface des agrégats issus de patients atteints d'atrophie multi-systématisée montre de fortes similitudes avec la surface obtenus pour les patients atteints de la maladie de Parkinson.

L'analyse des surfaces des agrégats a été notamment faite par protéolyse ménagée. De manière très intéressante, les profils protéolytiques des agrégats issus de patients atteints de la maladie de Parkinson ou d'atrophie multi-systématisée sont les mêmes que ceux que l'on obtient avec les souches agrégées *in vitro* de type « rubans ». Également, les profils protéolytiques des agrégats issus de patient atteints de démence à corps de Lewy sont très semblables aux profils obtenus pour les souches agrégées *in vitro* de type « fibres ». De plus, les profils protéolytiques des agrégats issus de patients montrent une certaine homogénéité en fonction de la synucléinopathie confortant l'hypothèse selon laquelle une souche d'alpha-synucléine correspondrait à une synucléinopathie (Van der Perren et al., 2020).

L'injection dans le cerveau de rats sur-exprimant de l'alpha-synucléine humaine de ces homogénats de cerveaux de patients atteints de différentes synucléinopathies entraîne des symptômes moteurs différents, plus importants chez les rats injectés par des homogénats de patients atteints d'AMS. Ce résultat indique que les souches issues de patients atteints d'AMS, bien qu'ayant un profil protéolytique après protéolyse ménagée par la protéinase K semblable à celui observé pour les agrégats issus de patients atteints de la maladie de Parkinson, sont significativement plus agressives. On observe également une atteinte plus importante des neurones dopaminergiques de la substance noire des rats injectés par des homogénats de patients atteints de la maladie de Parkinson ou d'AMS par rapport aux rats injectés par des homogénats de patients atteints de DLB. La propagation et la distribution spatiale des agrégats d'alpha-synucléine dans le cerveau des rats sur-exprimant de l'alpha-synucléine humaine diffère également en fonction des souches injectées.

L'ensemble de ces résultats montre que la structure des agrégats d'alpha-synucléine influence leurs propriétés pathologiques. L'existence des souches pourrait alors expliquer l'hétérogénéité des synucléinopathies. Beaucoup de questions restent cependant en suspens ; Quels sont les facteurs précis qui influencent la formation d'une souche ou d'une autre ? Qu'elle est l'impact de l'environnement cellulaire, des partenaires d'interactions ou encore de la quantité d'alpha-synucléine exprimée par les cellules (Courte et al., 2020) sur la formation et la propagation des souches ? Existe-t-il plusieurs souches pathologiques chez un même patient ? Quelles sont les caractéristiques structurales et fonctionnelles exactes de chaque souche ? Comment générer in vitro des souches présentant exactement les mêmes structures que les souches retrouvées chez les patients ? (Peelaerts et al., 2018, Peng et al., 2018).

e. Elucidation des structures de l'alpha-synucléine en condition pathologique

Les synucléinopathies seraient donc dues à la présence anormale d'agrégats d'alpha-synucléine fibrillaire dans le cerveau des patients. En fonction de la structure ou souche de ces fibres, les agrégats s'accumulent dans différentes régions cérébrales et différents types cellulaires entraînant ainsi des pathologies variées. La structure qu'empruntent les agrégats d'alpha-synucléine est donc un élément clef du développement des synucléinopathies. Dans ce paragraphe, nous allons détailler les structures des agrégats d'alpha-synucléine qui ont pu être décrites. Nous déterminerons des caractéristiques générales de l'organisation des fibres d'alpha-synucléine puis nous analyserons les connaissances souches-spécifiques acquises. A cause des techniques utilisées, la majorité des études apportent des informations concernant uniquement la structure interne très organisée des agrégats (c'est à dire leur squelette). Ces études n'apportent pas ou peu d'informations concernant les régions plus flexibles de l'alpha-synucléine agrégée.

L'alpha-synucléine est donc capable de s'assembler en fibres amyloïdes compactes et riches en feuilletés bêta. Des expériences de dichroïsme circulaire ont permis de déterminer que les fibres d'alpha-synucléine (recombinantes et agrégées *in vitro*) présentent environ 30% de feuilletés bêta (*Serpell et al., 2000, Lin et al., 2006*).

Différentes études structurales ont déterminé dans plusieurs polymorphes (formés *in vitro* ou extraits du cerveau de patients atteints de synucléinopathies) que la région du NAC (61-95) est nécessaire à l'agrégation de l'alpha-synucléine. Le cœur de cette fibre commencerait entre les acides-aminés 30 à 38 et se prolongerait jusqu'aux résidus 95 à 110 en fonction de la souche étudiée. L'extrémité C-terminale de l'alpha synucléine apparait flexible alors que l'extrémité N-terminale a une structure plus hétérogène en fonction du polymorphe (*Li et al., 2018, Vilar et al., 2008, Miake et al., 2002*). Il a été déterminé que la région entre les acides-aminés 71 et 82 est la région minimale, nécessaire et suffisante à l'agrégation de l'alpha-synucléine (*Giasson et al., 2000*).

Une autre caractéristique importante des fibres d'alpha-synucléine décrites est qu'elles sont composées de deux protofilaments (*Guerrero-Ferreira et al., 2018*). Les fibres d'alpha-synucléine sont donc composées 1) de protéines d'alpha-synucléine qui s'empilent les unes sur les autres afin de former un protofilament, 2) et d'un second protofilament qui fait face et s'assemble au premier.

La structure secondaire des souches analysées dans cette thèse a pu être élucidée par RMN (résonance magnétique nucléaire). Ces souches empruntent des structures différentes *in vitro* en fonction leur tampon d'agrégation. En effet, les fibres sont assemblées dans un tampon composé de 50mM de tris à pH 7.5 et de 150mM de KCl. Les rubans se forment dans un tampon avec une faible teneur en sel (5mM Tris) et les F91 dans un tampon basique (pH 9.1). La figure 11 présentent les structures secondaires de ces trois souches élucidées par RMN. On observe que ces 3 souches présentent une extrémité C-terminale sans structure secondaire définie et une région centrale structurée en feuillet bêta. Les structures secondaires de l'extrémité N-terminale sont très variables en fonction de la souche. Par exemple, les rubans montrent cinq feuillets bêta sur ses 40 premiers acides-aminés alors que les F91 n'en présentent aucun sur cette région (*Gath et al., 2014, Gath et al., 2011, Verasdonck et al., 2016*).

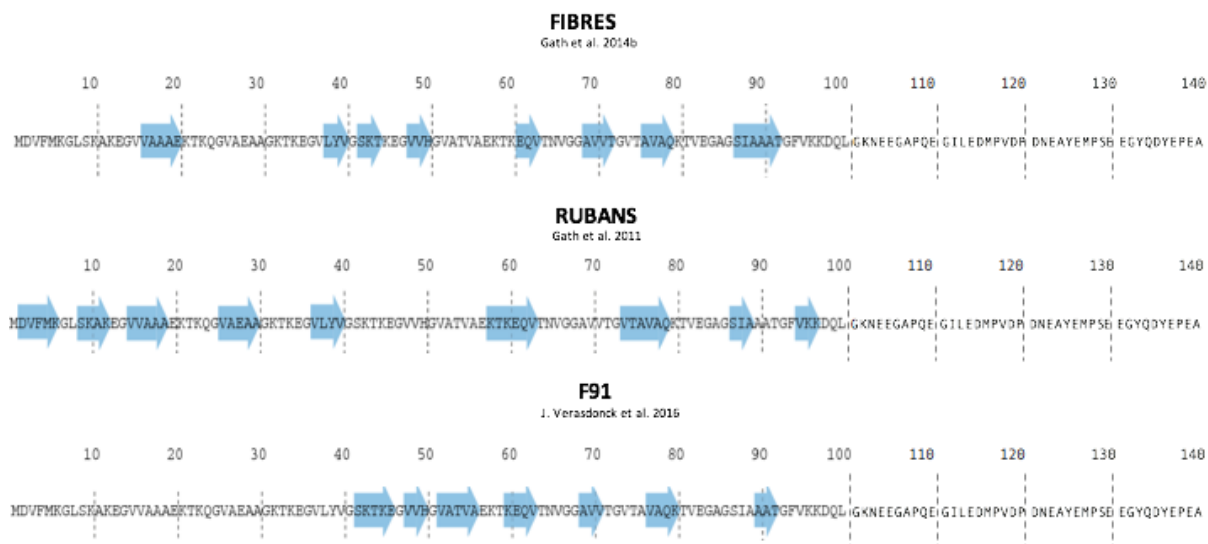


Figure 11: Structure secondaire de trois souches d'alpha-synucléine

Modifiée de Verasdonck et al., 2016, Localisation des feuillets bêta sur la séquence de l'alpha-synucléine des fibres, rubans et fibres 91 (F91) déterminé par RMN.

Des techniques de RMN du solide et de cryo-microscopie électronique ont permis de préciser la structure tertiaire du cœur de certains polymorphes agrégés *in vitro*.

En 2016, Tuttle et al. proposent la structure d'un protofilament déterminé par RMN du solide avec des feuillets bêta organisés selon un motif de clef grecque entre les acides-aminés 44 et 97. Ils décrivent également la présence d'un pont salin stable entre l'acide glutamique 46 et la lysine 80. Cette structure est représentée dans la figure 10. (*Tuttle et al., 2016*).

En 2018, trois équipes publient des structures du cœur de fibres d'alpha-synucléine. Ces trois équipes intègrent deux protofilaments d'alpha-synucléine dans leurs analyses permettant ainsi de déterminer des régions à l'interface de ces protofilaments. Guerrero-Ferreira et al. analysent de l'alpha-synucléine agrégée tronquée en C-terminale, après l'acide-aminé 121. Cette modification correspond à une troncature de l'alpha-synucléine par la caspase 1 dans des modèles cellulaires de la maladie de Parkinson (*Wang et al., 2016*). Ils décrivent la structure de la fibre entre les acides-aminés 38 et 95. Sur cette région, Guerrero-Ferreira et al. observent 8 feuillets bêta (entre les acides-aminés 42 et 46, 48 et 49, 52 et 57, 59 et 66, 69 et 72, 77 et 82, 94 et ~102) alternés par des résidus de glycine. Ils déterminent que l'interface entre les deux protofilaments correspond à la région 50 à 57. Dans ce modèle comme dans celui de Tuttle et al., un pont salin est suggéré entre l'acide-glutamique 46 et la lysine 80. Notons également que les mutations de l'alpha-synucléine associées aux synucléinopathies (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E, A53T) sont localisées dans le cœur de la fibre, à proximité de la région d'interface décrit ici (à l'exception de la mutation A30P) (*Guerrero-Ferreira et al., 2018*). Dans cette même année, Li Y. et al. et Li B. et al. proposent également des structures des fibres d'alpha-synucléine élucidées par cryo-électro microscopie. L'équipe de Li Y. et al. analyse des fibres d'alpha-synucléine recombinante humaine entière acétylées sur leurs extrémités N-terminales. La structure proposée par l'étude de Li Y. et al. est semblable à la structure obtenue par Guerrero-Ferreira et al., avec une interface entre les deux protofibrilles également localisée au niveau des acides aminées 50 à 57. On retrouve dans cette structure, comme dans les structures déterminées par Tuttle et al. et par Guerrero-Ferreira et al. une organisation de chaque protofilament en clé grecque (figure 12). Cette étude détermine également des interactions électrostatiques intramoléculaires entre l'histidine 50 et la lysine 45 et intermoléculaires entre l'histamine 50 et l'acide glutamique 57' ainsi que des ponts salins entre la lysine 58 et l'acide glutamique 61 et entre l'acide glutamique 46 et la lysine 80 (*Li Y. et al., 2018*). L'équipe de Li B. en revanche, présente la structure de deux polymorphes d'alpha-synucléine résolue par cryo-électro microscopie qu'ils désignent comme des fibres « rod » (= fibres droites) ou « twisted » (= fibres torsadées). Ces deux polymorphes présentent un noyau commun mais diffèrent au niveau de l'interface entre les deux filaments d'alpha-synucléine. Les fibres droites présentent une structure semblable aux structures en forme de clé grecque décrites précédemment, avec une interface entre les deux filaments d'alpha-synucléine localisée au niveau des acides-aminée 50 à 57 (figure 12). Les fibres torsadées en revanche présentent une région d'interface, entre les deux protofilaments, radicalement différente, entre les acides aminés 66 et 78. Cette différence au niveau de la région d'interface entraîne une organisation générale des deux protofilaments

complètement différente. Les auteurs de cette étude avancent l'hypothèse que les mutations associées aux synucléinopathies (à l'exception de la mutation A30P) promeuvent plutôt la formation de fibres de type torsadées car ces mutations, localisées sur la région d'interface des fibres droites seraient ainsi défavorables à leur formation (*Li B. et al., 2018*).

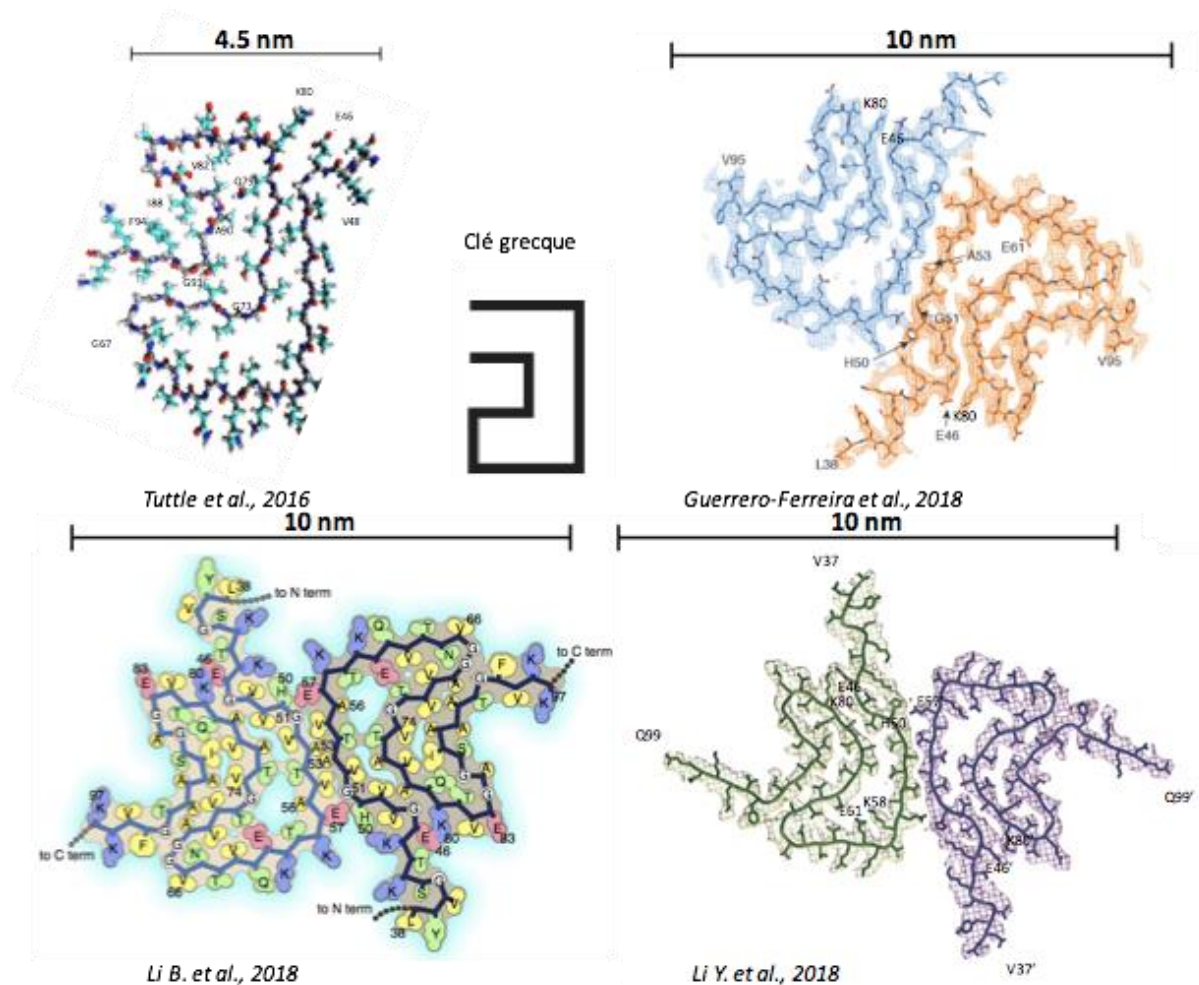


Figure 12: Organisation spatiale des fibres d'alpha-synucléine

Structures du cœur des fibres d'alpha-synucléine élucidée par RMN du solide (Tuttle et al.) ou par Cryo-électro microscopie (Guerrero-Ferreira et al., Li B. et al., Li Y. et al.,).

En 2019, Guerrero-Ferreira et al. publient un autre étude structurale mais en analysant cette fois-ci de l'alpha-synucléine entière agrégée dans un tampon Tris 50mM à pH7,5, KCl 150mM. Ils déterminent ainsi par cryo-électro microscopie la structure de deux nouveaux polymorphes

appelés polymorphes 2a et 2b, les polymorphes 1a et 1b correspondant aux structures déterminées par Li B. et al. Ces nouveaux polymorphes, également composés par deux protofilaments de 5 nm de diamètre chacun, présentent des interfaces au niveau des régions 45 à 57 (polymorphe 2a) ou 45 à 46 (polymorphe 2b). Comme dans l'étude de Li. B. et al., les deux polymorphes décrits diffèrent entre eux uniquement par la région d'interface entre les deux protofilaments. La structure des protofilaments décrite dans cette étude n'est en revanche pas identique à la structure des protofilaments décrite par les études précédentes (figure 13). En effet, les polymorphes 2a et 2b présentent une courbure au niveau des acides aminés 46 à 57 qui est absente chez les polymorphes 1a et 1b. Également, le polymorphe 1a montre une cavité hydrophobe entre les acides-aminés 46 à 60 environ alors que les polymorphes 2a et 2b ont une cavité hydrophobe localisée au niveau de la région 20 à 40. De plus, alors que les protofilaments des polymorphes 1 s'assemblent grâce à des interactions hydrophobes, les protofilaments des polymorphes 2a et 2b forment des interactions électrostatiques via des ponts salins entre les résidus 45 et 57 ou 45 et 46 respectivement. Enfin, une autre différence majeure est la présence d'un feuillet bêta au niveau des acides aminés 16 à 20 à proximité du cœur de la fibre pour les polymorphes 2 (*Guerrero-Ferreira et al., 2019*). Cette région est décrite comme flexible chez les polymorphes 1. La figure 13 présentent ces différences majeures entre les 4 polymorphes (1a, 1b, 2a, 2b).

Les résultats de ces études impliquent donc que les souches d'alpha-synucléine peuvent différer non seulement par la structure qu'emprunte chacun des protofilaments d'alpha-synucléine mais également par des différences d'assemblage entre les deux protofilaments. *In vitro*, le tampon de polymérisation ainsi que la concentration d'alpha-synucléine monomérique influencent la formation d'un polymorphe ou d'un autre.

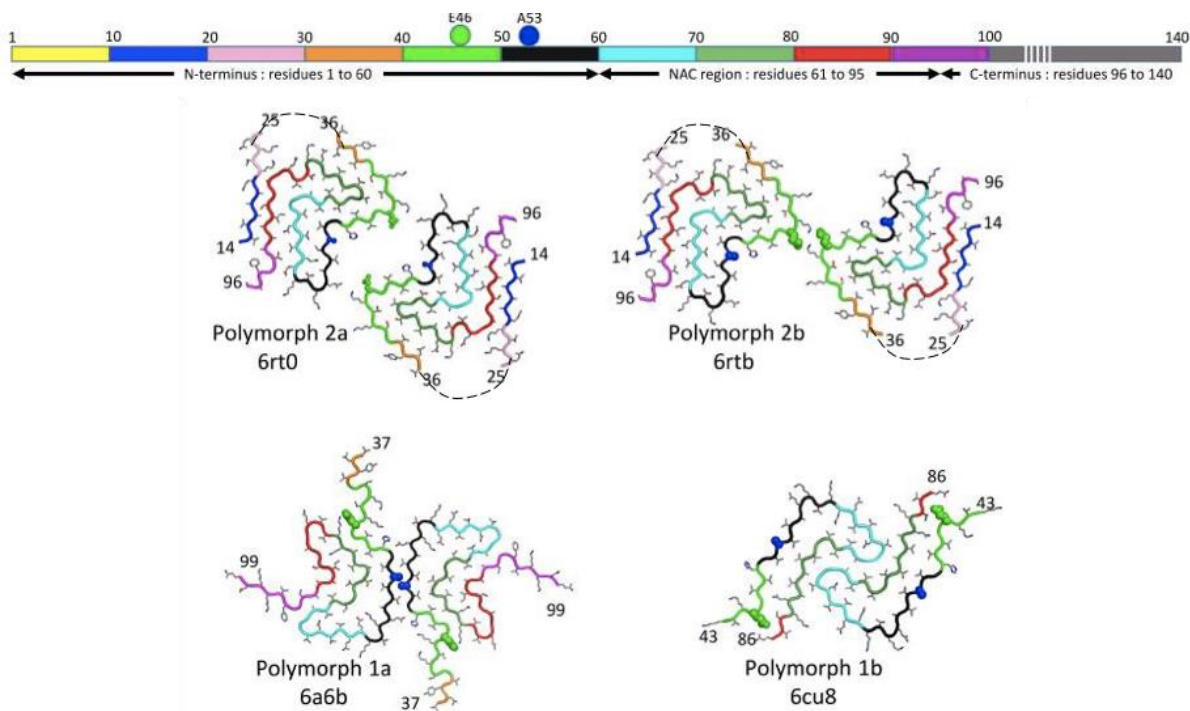


Figure 13: Structures de différents polymorphes d'alpha-synucléine

Modifiée de Guerrero-Ferreira et al., 2019, Comparaison de la structure des polymorphes 1a, 1b, 2a, 2b.

Différents polymorphes ou souches peuvent donc être agrégés et caractérisés structuellement in vitro. L'étude de la structure des agrégats issus de patients atteints de synucléinopathies apparaît essentielle afin de vérifier que les fibres produites in vitro présentent effectivement la même structure. Comme nous l'avons déjà mentionné, il est également indispensable de savoir si une souche d'alpha-synucléine correspond à une pathologie ou si plusieurs souches co-existent chez un même patient. Il serait également intéressant de comprendre précisément les facteurs intervenant dans la formation d'une souche ou d'une autre. Dans une optique thérapeutique, il apparaît indispensable de pouvoir déterminer, en plus de la structure interne, la surface accessible des différentes souches d'alpha-synucléine afin de pouvoir cibler spécifiquement ces agrégats. C'est l'objectif principale de cette thèse.

4. Objectifs de l'étude

La compréhension des structures des souches d'alpha-synucléine impliquées dans les synucléinopathies est essentielle à la mise en place d'outils diagnostics ou thérapeutiques.

Notre équipe a mis au point *in vitro* des conditions d'assemblages permettant de générer différentes souches « pures » d'alpha-synucléine appelées fibres, rubans, fibres 91 et fibres 65. Ces souches ont précédemment été caractérisées par microscopie électronique, microscopie à force atomique et par des expériences de protéolyses ménagées par la protéinase K (*Bousset et al. 2013, Makky et al., 2016, Shrivastava et al.*). Notre équipe a également décrit la structure secondaire des trois souches étudiées dans cette thèse (fibres, rubans et F91) par RMN (*Gath et al. 2014, Gath et al. 2012, Verasdonck et al. 2016*). Enfin, la structure interne de nos assemblages appelés « fibres » a récemment pu être élucidée par cryo-électro microscopie (*Guerrero-Ferreira et al., 2019*).

In cellulo, nous avons montré que les agrégats d'alpha-synucléine lient la membrane plasmique des neurones issus de cultures primaires de manière souche-spécifique (*Shrivastava et al., 2020*). *In vivo*, lorsque les fibres, les rubans ou les F91 sont injectées à des animaux elles se propagent dans le cerveau et entraînent l'agrégation de l'alpha-synucléine endogène. Cette propagation

est stéréotypée et plus ou moins étendue en fonction de la souche injectée (*Rey et al., 2019*). Également, l'injection dans la substance noire de rats de fibres ou de rubans entraîne des pathologies distinctes. En effet, 7 jours après l'injection, des inclusions de type corps de Lewy contenant de l'alpha-synucléine phosphorylée sur la serine 129 sont observés dans les neurones de la substance noire. Chez les rats injectés avec des rubans, ces inclusions sont considérablement plus importantes et sont également visibles dans les oligodendrocytes (comme chez les patients atteints d'atrophie multi-systématisée). Ce phénomène n'est pas observé dans le cerveau des rats à qui l'on a injecté des fibres. En revanche, ces rats présentent des déficits moteurs plus marqués 4 mois après l'injection systémique de fibres (*Peelaerts et al., 2015*). Enfin, une récente étude en collaboration avec notre équipe montre que les souches que nous générons *in vitro* présentent une surface définie par protéolyse ménagée par la protéinase K semblable à celle des agrégats retrouvés chez des patients atteints de synucléinopathies. En effet, le profil protéolytique des rubans est très proche des profils protéolytiques obtenus à partir d'agrégats d'alpha-synucléine issus de patients atteints de la maladie de Parkinson ou d'AMS. De la même manière, le profil protéolytique des fibres ressemble à celui obtenu pour les agrégats issus de patients atteints de DLB (*Van Der Perren et al., 2020*). L'ensemble de ces résultats soutiennent donc l'hypothèse que la structure des agrégats d'alpha-synucléine détermine la pathologie engendrée.

Cette thèse a pour but de d'élucider, non plus la structure interne de ces agrégats mais leurs surfaces. En effet, la caractérisation de ces surfaces accessibles a un intérêt à la fois diagnostic et thérapeutique. Elle pourrait permettre la conception de molécules ciblant spécifiquement ces épitopes. Si une souche est bien reliée à une pathologie, il serait alors possible grâce à ces outils, de diagnostiquer et de stratifier de manière fiable les patients atteints de synucléinopathies. Également, ces molécules pourraient lier avec une forte spécificité l'alpha-synucléine extra-cellulaire présente sous forme agrégée dans le cerveau des patients (voir même dans le système périphérique à des phases très précoces de la maladie) et empêcher sa propagation. Des études cliniques avec une approche d'immunothérapie passive de ce type sont en cours. Les résultats montrent que ces molécules sont bien tolérées mais leur efficacité pourrait être largement augmentée si l'on définissait des épitopes plus spécifiques des formes pathologiques de l'alpha-synucléine. Les 2 anticorps actuellement en essai clinique (PRX002, *Jankovic et al.*, et BIIB054, *Brys et al.*) ciblent respectivement les régions 118-126 et 1-10 de l'alpha-synucléine qui sont régulièrement retrouvées tronquées dans le cerveau des patients (15 à 30% des formes, *Kellie et al.*) et ne peuvent par conséquent pas se lier à tous les agrégats d'alpha-synucléine.

Afin de déterminer la surface accessible de trois souches d'alpha-synucléine générées *in vitro* (fibres, rubans, fibres 91) nous avons utilisé différentes approches complémentaires. Les méthodologies mises en œuvre et optimisées seront présentées dans un second chapitre, avant de développer les principaux résultats obtenus.

Dans un premier temps, nous avons mis en place des approches combinant protéolyses ménagées, spectrométrie de masse et immuno-détection pour cartographier *in vitro* la surface des différentes souches d'alpha-synucléine. Pour cela, nous avons optimisé les conditions de protéolyses ménagées en utilisant plusieurs enzymes aspécifiques (protéinase K, thermolysine, élastase) de manière à générer des profils protéolytiques souche-spécifiques. Nous avons ensuite identifié les polypeptides générés par protéolyse ménagée par immuno-détection grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques de différentes régions de l'alpha-synucléine et par spectrométrie de masse. Nous avons complété l'analyse de la surface de ces souches par des expériences d'échange hydrogène-deutérium couplées à la spectrométrie de masse de type MALDI-MS, compatible avec la petite taille de l'alpha-synucléine et avec l'analyse d'agrégats protéiques insolubles (*Redeker et al., 2007*). Nous avons également déterminé l'accessibilité de la surface des souches à plusieurs anticorps ciblant spécifiquement différentes séquences et régions de l'alpha-synucléine.

Dans un second temps, nous avons exploré les différences d'accessibilité des surfaces des souches dans un contexte cellulaire. Pour cela, nous avons exposé des cultures primaires de neurones et d'astrocytes aux différentes souches. Nous avons ainsi pu déterminer des propriétés d'internalisation souche-spécifiques et cellule-spécifiques. Nous avons également généré *in cellulo* des formes tronquées de l'alpha-synucléine. Ces régions tronquées correspondent à des régions accessibles aux enzymes dans un contexte cellulaire.

CHAPITRE 2 : METHODOLOGIES ET OPTIMISATIONS

Dans cette partie, nous détaillerons les principes et intérêts des techniques et méthodologies qui ont justifié leur utilisation au cours de ce travail de thèse, ainsi que les optimisations réalisées. Les résultats obtenus grâce à ces approches seront détaillés et discutés dans le chapitre 3.

1. Contrôle de l'assemblage des souches d'alpha-synucléine

a. Méthodes d'assemblage

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de cartographier la surface de trois souches générées *in vitro* à partir d'alpha-synucléine humaine recombinante, les fibres, les rubans et les fibres 91. J'ai également étudié une quatrième souche, les fibres 65, lors de cette thèse. Cependant, les résultats obtenus avec ces fibres 65 étant très proches, voir identiques, à ceux obtenus pour les fibres, ils ne seront pas détaillés dans les résultats de ce manuscrit.

Les tampons d'assemblage

Afin de générer des souches d'alpha-synucléine pures et de manière reproductible j'ai utilisé des conditions d'agrégation très strictes, précédemment décrites (*Bousset et al., 2013, Verasdonck et al., 2016, Makky et al., 2016*).

J'ai fait agréger de l'alpha-synucléine monomérique humaine recombinante, que j'ai préalablement purifiée selon une méthodologie habituelle dans notre laboratoire (*Ghee et al., 2005*) (figure 14 a), tout d'abord sous forme de fibres. Pour cela, j'ai utilisé un tampon à teneur en sel physiologique (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM KCl) et agrégé l'alpha-synucléine pendant plusieurs jours (3 à 4 jours) sous agitation (300rpm) et à 37°C. La formation des rubans et des fibres 91 nécessite une étape préalable de dialyse pendant douze heures, respectivement dans un tampon à faible teneur en sel (5mM Tris-HCl pH 7.5) ou à pH basique (Na₂HPO₄, pH 9.1). A la suite de cette dialyse, l'alpha-synucléine s'assemble sous forme de rubans ou de fibres 91 au bout d'environ 10 jours, également sous agitation (300rpm) et à 37°C. La formation des fibres 65 nécessite elle-aussi une étape de dialyse mais dans un tampon plus acide (20mM MES pH 6.5, 150mM NaCl). Les fibres 65 s'assemblent ensuite après quelques jours, à 37°C, sous agitation.

L'utilisation de ces tampons et conditions d'agrégation entraîne la formation d'agrégats de structure reproductible permettant ainsi de comparer les résultats obtenus dans différentes études de notre équipe. L'homogénéité de mes préparations est nécessaire afin d'analyser, dans un échantillon présentant une quantité de matériel importante, un seul type de souche, un seul type de surface (*Alam et al., 2019*). Nous verrons par la suite comment nous pouvons contrôler la reproductibilité et l'homogénéité de nos assemblages.

Le suivi de l'agrégation

L'agrégation des différents polymorphes est suivie par fluorescence, après fixation de la Thioflavine T aux souches d'alpha-synucléine.

Historiquement, la thioflavine T est un composé qui a été utilisé pour marquer les fibres de type amyloïdes présentes au niveau de coupes histologiques (*Vassar et Culling, 1959*). En effet, à la suite de sa liaison à des composés amyloïdes présentant une abondance de feuilletts bêta, le spectre de fluorescence de la Thioflavine T excitée à 450nm se décale pour émettre un spectre à 480nm. Ce composé est donc habituellement utilisé pour suivre la cinétique d'agrégation de fibres amyloïde tel que l'alpha-synucléine (*Conway et al., 2000*) bien qu'il ne marque pas toutes

les structures amyloïdes et surtout, que l'efficacité de ce marquage ne soit pas équivalente pour toutes les souches d'alpha-synucléine (Bousset *et al.*, 2013). En effet, les rubans ne lient pas ou très peu la thioflavine T. La figure 14 b présente un exemple de cinétique d'agrégation de l'alpha-synucléine sous forme de fibres suivie par fixation de la Thioflavine T.

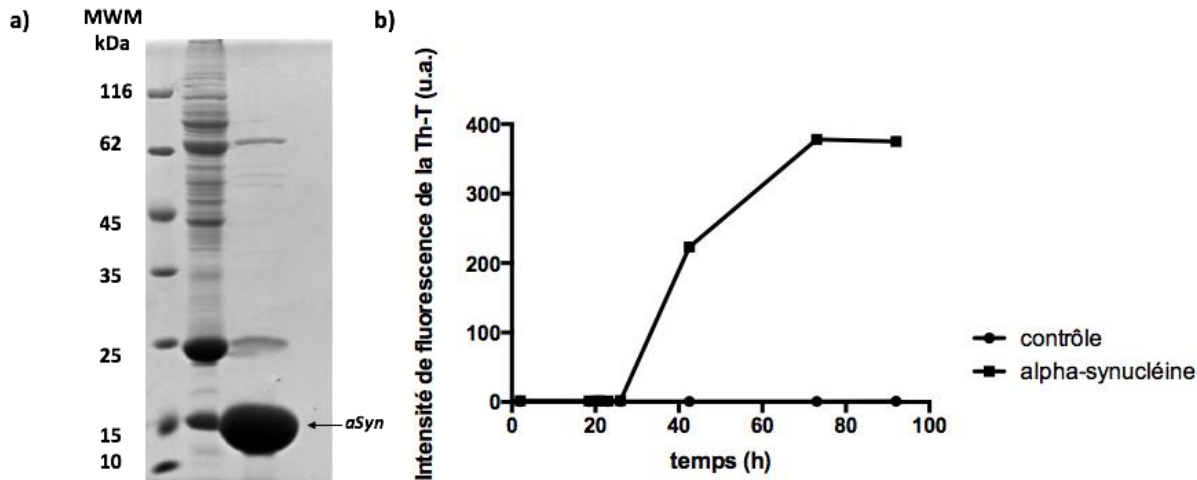


Figure 14 : Purification et agrégation de l'alpha-synucléine

Migration sur gel SDS-PAGE d'alpha-synucléine monomérique humaine recombinante avant et après la dernière étape de purification (centrifugation et chauffage à 80°C) (a). Exemple de la cinétique de polymérisation de l'alpha-synucléine en fibres suivie par l'excitation de la Thioflavine T à 450nm émettant une fluorescence lorsqu'elle est liée aux structures amyloïdes à 480nm.

Le tampon utilisé pendant l'assemblage des monomères d'alpha-synucléine est donc un élément déterminant pour la structure qu'emprunte les agrégats. Des conditions d'assemblages contrôlées permettent l'obtention de polymorphes de structures homogènes et hautement reproductibles, des caractéristiques indispensables à toute étude portant sur ce type d'assemblage. La cinétique d'agrégation des fibres, des fibres 91, et dans une moindre mesure des rubans peut être facilement suivi grâce à la Thioflavine T.

b. Méthodes de caractérisation

Bien que les conditions d'agrégation des différentes souches soient strictes, il est nécessaire de contrôler le repliement de ces assemblages. Pour cela, j'ai utilisé deux techniques : la

microscopie électronique à transmission (dont les images ont été acquises par le Dr. Luc Bousset) et la protéolyse ménagée par la protéinase K.

La microscopie électronique

Le principe de la microscopie électronique à transmission est de projeter un faisceau, non plus de photons mais d'électrons sur l'échantillon. Ces électrons présentent une longueur d'onde plus faible et permettent ainsi une amélioration considérable de la résolution (de l'ordre de la centaine de picomètres).

L'utilisation de la MET m'a permis d'observer la présence, la morphologie et l'homogénéité des agrégats assemblés (qui ont une largeur d'environ 10nm). En effet, en fonction de la souche d'alpha-synucléine considérée, l'aspect des agrégats est différent. Ces morphologies ont été précédemment décrites et sont caractéristiques de chacune des souches (*Bousset et al., 2013, Makky et al., 2016*). Les fibres, présentent une structuration droite, cylindrique, à la manière des spaghettis alors que les rubans ont un aspect plus plat, comme des linguines, et montrent des torsions. Les fibres 65 et les fibres 91 ont également une apparence cylindrique. Cependant, les fibres 65 sont légèrement plus épaisses que les fibres et les fibres 91 présentent une surface plus trouble (figure 15).

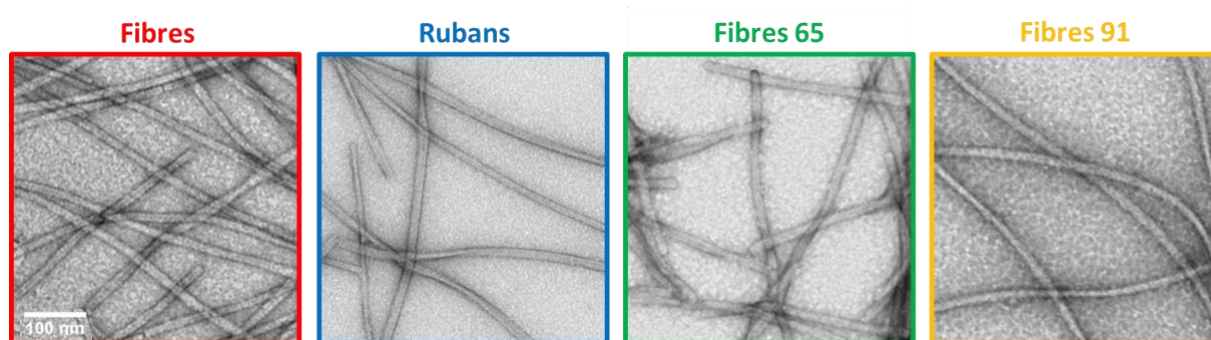


Figure 15 : Microscopie électronique

Images de microscopie électronique des différentes souches d'alpha-synucléine (fibres, rubans, fibres 65 et fibres 91).

L'avantage de la microscopie est que l'on obtient une vision d'ensemble direct de l'organisation générale des fibres présentes dans notre échantillon. En revanche, la résolution de cette technique est trop faible pour mettre en évidence de petites variations structurales.

La protéolyse ménagée

Afin de vérifier la structuration de mes assemblages, je les ai également caractérisés par protéolyse ménagée. Cette technique est employée dans le but de déterminer les caractéristiques conformationnelles d'une protéine. Le principe est d'incuber la protéine à étudier avec une protéase dans des conditions limitantes (temps court, faible concentration de protéases). De cette manière, la protéase clivera préférentiellement les liaisons peptidiques de la protéine au niveau de ses sites de coupure sur les régions peu structurées, accessibles au solvant, et sur une région suffisamment étendue (environ une dizaine d'acides-aminés) permettant à la protéase de se lier au niveau du site de coupure (*Fontana et al., 2004*). Les produits de protéolyse sont ensuite séparés en fonction de leur masse apparente grâce à une migration sur gel SDS-PAGE afin d'observer un profil électrophorétique caractéristique, dépendant de la surface accessible des protéines (figure 16).

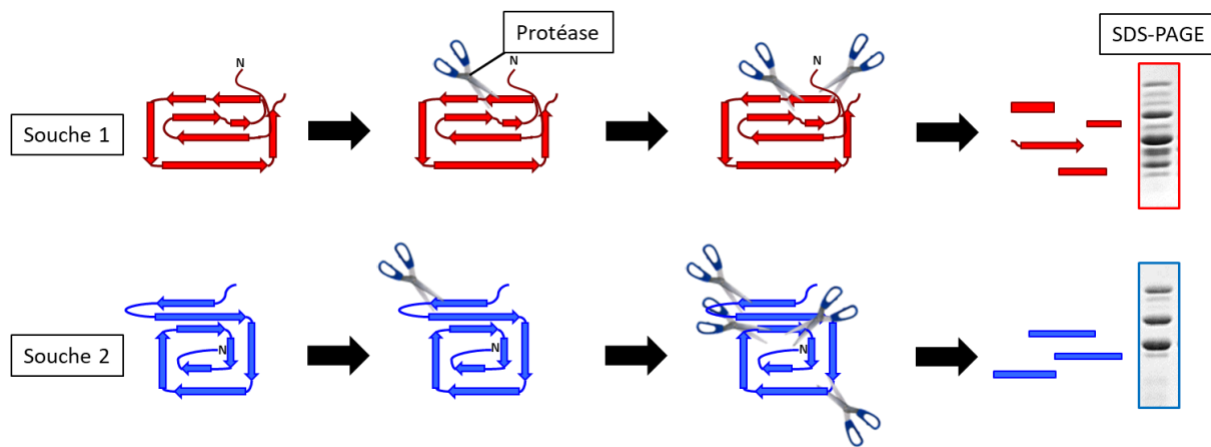


Figure 16: La protéolyse ménagée

Modifiée d'Alexis Fenyi. Principe de la technique de protéolyse ménagée ; exemple de la digestion de deux types d'assemblages protéiques ayant des structures différentes entrainant des profils protéolytiques uniques en fonction de la souche.

La nature fibrillaire des assemblages d'alpha-synucléine entraîne une solubilisation et par conséquent une pénétration dans le gel incomplète. Afin de pallier cette difficulté, les échantillons protéolysés ont été asséchés (à l'aide d'un speedVac) avant d'être solubilisés grâce au solvant HFIP (hexafluoropropan-2-ol) avant leur dénaturation classique avec du tampon Laemmli et leur migration sur gel.

Les différentes souches étudiées dans cette thèse présentent des profils protéolytiques, après digestion ménagée par la protéinase K, hautement caractéristiques et reproductibles (figure 17). Ces conditions de digestion ont été optimisés dans l'équipe précédemment et ces profils ont

déjà été publiés à plusieurs reprises. Ils constituent l'équivalent « d'empreintes digitales » de nos souches (*Bousset et al., 2013, Shrivastava et al., 2020*).

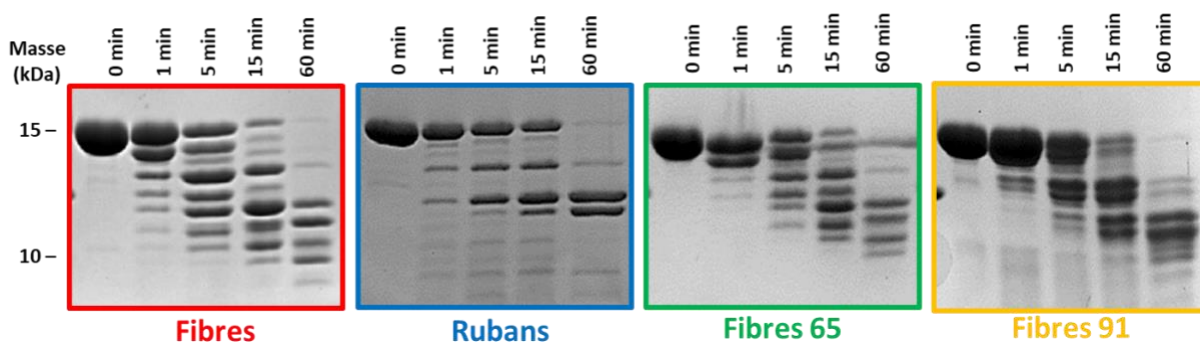


Figure 17 : Profils protéolytiques

Profils protéolytiques (SDS-PAGE, 15%) des souches d'alpha-synucléine digérées par la protéinase K pendant 0, 1, 5, 15 ou 60 minutes.

La protéolyse ménagée et la microscopie électronique me permettent donc de contrôler la qualité, la morphologie, et l'homogénéité structurale des agrégats et assurent ainsi la cohérence et la reproductibilité des expériences.

2. Cartographie des surfaces accessibles des souches d'alpha-synucléine

a. Cartographie des surfaces par protéolyse ménagée

Les techniques d'analyses structurales « classiques » tel que la RMN, la cristallographie ou la cryo-microscopie par exemple sont des outils puissants pour obtenir des informations concernant les régions très structurées des protéines (*Gath et al., 2014, Guerrero-Ferreira et al., 2019*). La surface de nos agrégats correspond cependant à des régions moins organisées, plus flexibles, de la protéine. J'ai donc mis en place et optimisé des techniques d'analyses différentes des techniques classiques de biologie structurale afin de cartographier ces surfaces.

Principe et intérêt des protéolyses ménagées

Comme il a été expliqué précédemment, la technique de protéolyse ménagée permet de digérer l'alpha-synucléine agrégée au niveau de séquences d'acides aminés exposées à la surface de la protéine fibrillaire. En plus d'utiliser cette méthode pour obtenir des profils caractéristiques des souches d'alpha-synucléine, je l'ai également utilisée pour cartographier la surface de ces assemblages en identifiant les produits polypeptidiques de ces protéolyses ménagées, à la fois par immuno-détection avec des anticorps anti-synucléine ciblant des séquences et des régions différentes de la protéine et par spectrométrie de masse. En effet, l'identification précise des peptides protéolytiques et de leurs extrémités N- et C- terminales permet d'identifier les sites de coupure protéolytiques accessibles aux protéases.

Ce type d'approches de protéolyse ménagée combinée à une analyse par spectrométrie de masse a déjà été mise en place sur des formes monomériques de l'alpha-synucléine en présence ou non de micelles de SDS (la liaison de l'alpha-synucléine aux micelles de SDS induit la formation d'une hélice alpha sur la région N-terminale) (*Hossain et al., 2002, Polverino de Laureto et al., 2006*). Ces études ont permis de mettre en évidence la résistance à la dégradation par des enzymes physiologiques de la région NAC de l'alpha-synucléine ou encore une petite structuration de la région C-terminale de l'alpha-synucléine en présence de micelles de SDS. L'analyse par protéolyse ménagée de la surface d'assemblages protéiques a également été utilisée pour décrire la surface d'autres types d'agrégats comme les assemblages de la protéine Tau (*Von Bergen et al., 2006*). Cette approche permet donc de décrire des régions de surfaces protéiques dans différentes conditions mais n'a jamais été mis en place pour comparer la surface de souches d'alpha-synucléine agrégées. En revanche, la sensibilité de l'analyse des surfaces protéiques par protéolyse ménagée reste limitée par les sites de coupures de la protéase utilisée ainsi que par le fait que la région accessible doit présenter une taille suffisante (environ 10 acides aminés) pour que la protéase puisse se fixer.

Mises au point des protéolyses ménagées

Afin d'optimiser au maximum la sensibilité des résultats, j'ai utilisé trois enzymes peu spécifiques pour effectuer ces expériences de protéolyse ménagée : la protéinase K, la thermolysine et l'élastase. En effet, ces enzymes présentent des sites de coupures théoriques tout au long de la séquence d'alpha-synucléine (figure 18) et ne seront donc pas ou peu limitées par leur spécificité de coupure mais plutôt par l'accessibilité de ces sites.

Protéinase K

```
1 MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH GVATVAEKTk EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK  
81 TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA
```

Thermolysine

```
1 MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH GVATVAEKTk EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK  
81 TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA
```

Elastase

```
1 MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH GVATVAEKTk EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK  
81 TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA
```

Figure 18: Sites de coupure préférentiels des enzymes

Sites de coupure préférentiels de la protéinase K, de la thermolysine et de l'élastase indiqués sur la séquence de l'alpha-synucléine (source: MS-Digest).

La protéolyse ménagée par la protéinase K ayant déjà été mise en place dans notre équipe afin de caractériser les différentes souches, j'ai donc utilisé les conditions de digestion précédemment décrites (Bousset et al., 2013).

En revanche, j'ai effectué plusieurs mises au point afin de déterminer des conditions de digestion optimale pour la thermolysine (figure 19) et l'élastase. J'ai choisi des ratios enzyme : protéine permettant une dégradation totale de la protéine monomérique après 15 minutes de digestion, témoignant d'une protéolyse efficace des régions non structurées. Ces ratios entraînent également une dégradation partielle des assemblages d'alpha-synucléine, avec une persistance d'une faible proportion d'alpha-synucléine entière, jusqu'à 60 minutes de digestion, témoignant d'une résistance du cœur des agrégats à la protéolyse.

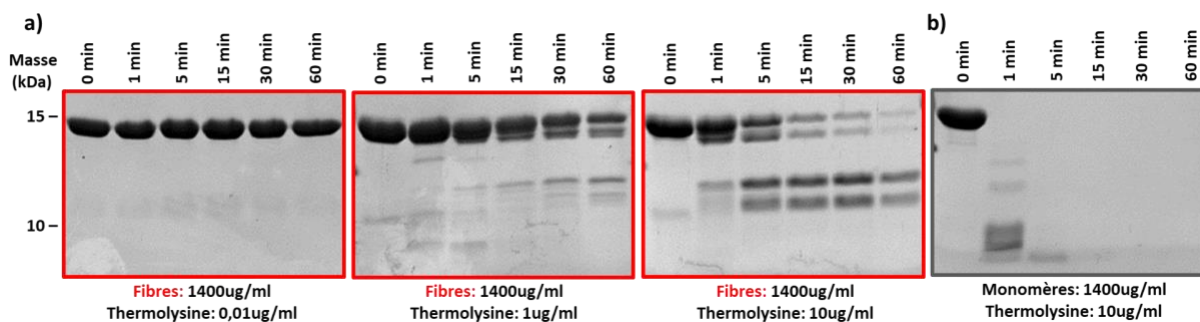


Figure 19 : Mises au point de la protéolyse ménagée par la thermolysine

Mises au point de la protéolyse ménagée des fibres avec différentes concentrations de thermolysine (0.01ug/ml, 1ug/ml, 10ug/ml). La concentration de 10ug/ml de thermolysine pour 1400ug/ml d'alpha-synucléine a été retenue pour les expériences (a). Protéolyse ménagée des monomères d'alpha-synucléine aux mêmes ratios enzyme : substrat montrant une protéolyse totale des monomères après 15 minutes (b).

Les ratios enzyme : alpha-synucléine (masse : masse) choisis et correspondant à ces critères sont de 1 :370 pour la protéinase K, de 1 : 140 pour la thermolysine et de 1 : 30 pour l'élastase.

Les résultats montrent que les profils protéolytiques des trois souches digérées par la thermolysine et l'élastase sont semblables, en particulier pour les fibres et les rubans, seuls les cinétiques de

(figure 20).

peptides

souches

deux enzymes

marquage

des résultats

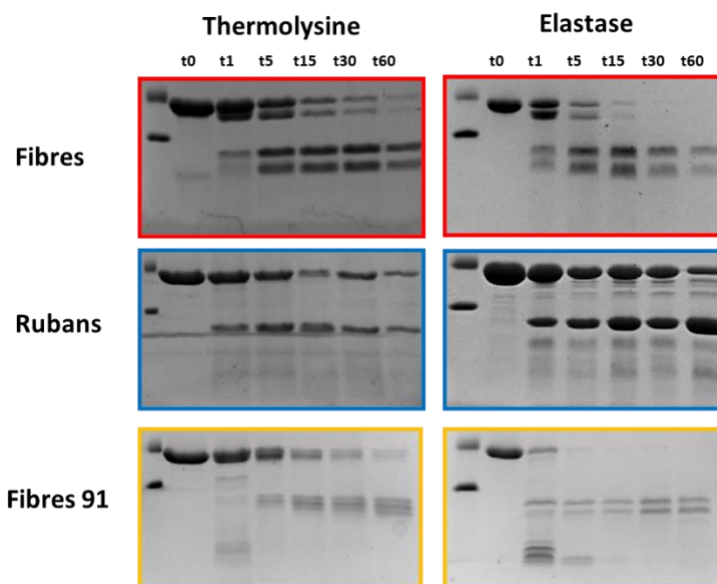
avons donc

concentrer sur

peptides

protéinase K et

uniquement.



digestion varie

L'identification des

protéolytiques des

digérées par ces

par immuno-

donne également

similaires. Nous

décidé de nous

l'identification des

générées par la

la thermolysine

Figure 20 : Comparaison des profils protéolytiques des souches digérées par la thermolysine et l'élastase.

Profil SDS-PAGE des digestions ménagées des fibres, rubans et fibres 91 par la thermolysine ou l'élastase pendant 0, 1, 5, 15, 30 ou 60 minutes

Identification des produits protéolytiques par immunomarquage

J'ai choisi d'identifier les peptides protéolytiques générés après 15 minutes de protéolyse. A ce temps, un maximum de peptides, et donc d'informations structurales potentielles, sont générées en particulier pour les protéolyses ménagées par la protéinase K. Également, après 15 minutes de protéolyse, une quantité non-négligeable d'alpha-synucléine entière persiste, témoignant que la protéolyse ménagée reste spécifique des régions de surface de la protéine. La pérennité de l'état fibrillaire et insoluble de nos souches a également été contrôlée par microscopie électronique et ultracentrifugation (cf résultats). En effet, après 15 minutes de protéolyse, les peptides protéolytiques sont tous retrouvés dans le culot. Ils ne sont donc pas solubles. De plus, l'observation par microscopie électronique des différentes souches après 15 minutes de protéolyse nous montre qu'elles demeurent encore sous un état fibrillaire.

Afin d'identifier les fragments protéolytiques générés, j'ai dans un premier temps effectué des immuno-marquages des produits protéolytiques puis, dans un second temps j'ai analysé ces peptides par spectrométrie de masse. La combinaison des résultats obtenus grâce à ces deux méthodologies m'a permis d'identifier l'ensemble des peptides générés après 15 minutes de protéolyse ménagée.

L'utilisation de différents anticorps monoclonaux spécifiques de plusieurs régions de l'alpha-synucléine m'a permis de déterminer si les peptides générés par protéolyse ménagée étaient tronqués au niveau des régions N- et/ou C- terminales de la protéine. En particulier, j'ai utilisé l'anticorps ASyM, spécifique de la région 1-15 de l'alpha-synucléine et l'anticorps 10D2, spécifique de la région 118-127 de l'alpha-synucléine. En effet, si l'anticorps ASyM ne reconnaît

pas un peptide, c'est donc que celui-ci a été tronqué au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine. De la même manière, si l'anticorps 10D2 ne reconnaît pas un peptide, c'est que celui-ci a été tronqué au niveau de la région C-terminale de la protéine. J'ai également utilisé les anticorps 5G4 et 10C3 ciblant respectivement les régions 46-53 et 98-105 de l'alpha-synucléine afin de compléter cette analyse. La figure 21 a) présente la position des épitopes de ces anticorps sur la séquence de l'alpha-synucléine.

A la suite de l'exposition des membranes à ces premiers anticorps, je les ai décrochés (par « stripping ») puis j'ai réexposé toutes les membranes à l'anticorps Syn1 ciblant la région 91-99 de l'alpha-synucléine. Cet anticorps reconnaît l'ensemble des bandes observées par SDS-PAGE et cette seconde exposition m'a permis de confirmer la présence de tous les fragments attendus dans l'échantillon.

La figure 21 b) et c) présente l'exemple des fibres protéolysées par la protéinase K, la thermolysine et l'élastase pendant 15 minutes et immuno-marquées par l'anticorps Syn1 (en vert), ou les anticorps ASYM et 10D2 (en rouge). La superposition des images permet d'identifier les peptides tronqués au niveau de l'extrémité N-terminale (pour ASYM) ou C-terminal (pour 10D2) qui sont alors colorés en vert (car uniquement reconnus par l'anticorps Syn1).

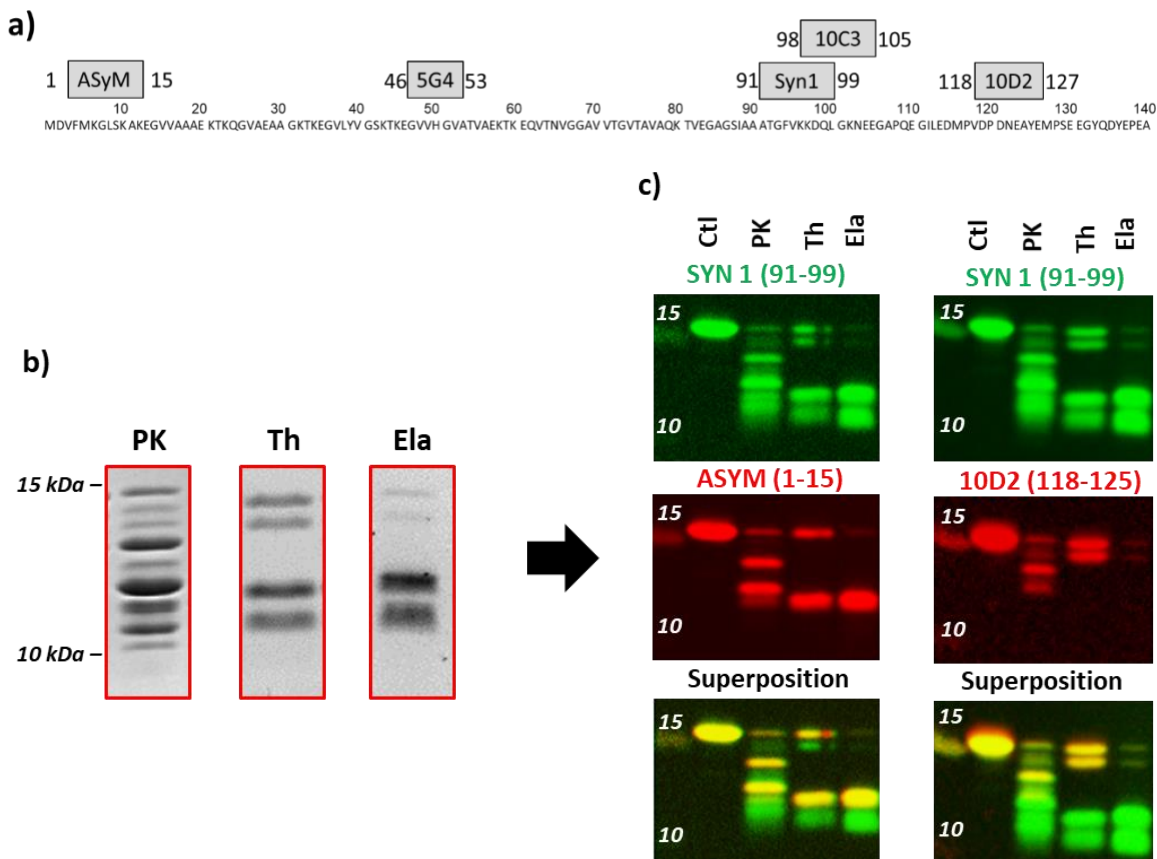


Figure 21 : Identification des peptides protéolytiques par immuno-marquage

Epitopes reconnus par les anticorps utilisés, sur la séquence de l'alpha-synucléine (ASyM 1-15, 5G4 46-53, Syn1 91-99, 10C3 98-105, 10D2 118-127) (a). Profil SDS-PAGE des fibres protéolysées 15 minutes par la protéinase K (PK), la thermolysine (Th) ou l'élastase (Ela) (b) et identification des peptides par immuno-marquage grâce aux anticorps Syn1 (91-99, en vert), ASYM (1-15, en rouge) et 10D2 (118-127 en rouge). Les peptides tronqués et donc marqués uniquement par l'anticorps Syn1 sont en vert sur les images superposées (c).

Ces immuno-marquages me permettent donc de déterminer quelles régions ont été éliminées ou conservées suite à la protéolyse. Cependant, ils ne donnent pas d'informations précises sur les sites de coupure. J'ai donc déterminé la masse des peptides protéolytiques par spectrométrie de masse afin de compléter et d'affiner les résultats obtenus et identifier précisément les extrémités N- et C-terminales des fragments générés.

Principe de la spectrométrie de masse MALDI-MS

La spectrométrie de masse est une technique permettant de mesurer le rapport masse sur charge (m/z) d'une molécule préalablement ionisée. L'échantillon subi une ionisation grâce à une source d'ion puis entre dans un analyseur qui sépare les différents ions générés en fonction de leur rapport masse sur charge. Un détecteur permet de détecter et compter les ions séparés par l'analyseur pour produire un courant électrique proportionnel au nombre d'ions.

Il existe différents types de spectromètre de masse en fonction de la source d'ion et de l'analyseur. J'ai, au cours de cette thèse, utilisé majoritairement un appareil de type MALDI-TOF-TOF.

« MALDI » pour « Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization » (Ionisation/ désorption laser assistée par une matrice) correspond à la source d'ion. L'échantillon à analyser est co-cristallisé avec une solution de matrice sur un support solide. Ce mélange, une fois sec, est irradié par un laser UV entraînant l'évaporation de la matrice, et avec elle de l'échantillon en phase gazeuse (désorption). La matrice possède une forte absorption à la longueur d'onde utilisée et la quantité d'énergie appliquée par le laser va ainsi permettre un transfert des charges des

molécules ionisées de la matrice aux molécules de l'échantillon (ionisation). Il existe différentes matrices présentant des efficacités d'ionisation dépendantes de l'échantillon à analyser, en particulier de la gamme de masse d'intérêt. J'ai utilisé deux types de matrices au cours de cette thèse : la matrice HCCA (acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique) permettant une ionisation efficace des peptides de faible masse et la matrice SA (acide sinapinique) permettant une ionisation efficace des peptides de masse plus importante (environ >5000 Da) ou des protéines.

Le principe d'un analyseur de type « TOF » pour « time of flight » (temps de vol) est de déterminer le rapport masse/ charge d'une molécule ionisée et accélérée par un champ électrique en fonction du temps nécessaire à cet ion pour parcourir un tube de vol vide. En effet, les ions vont tous recevoir une même quantité d'énergie qui les pousse vers le détecteur. En fonction de leur rapport masse/charge, ils auront des temps de vol différents. Les molécules de plus haut poids moléculaire auront ainsi un temps de vol plus long. Un analyseur « TOF-TOF » correspond au couplage de deux analyseurs de type « TOF ». Un analyseur TOF-TOF permet notamment la fragmentation des ions. Il est donc possible d'effectuer une analyse de type MS/MS avec un appareil de type MALDI-TOF-TOF, c'est-à-dire qu'un ion précurseur sera fragmenté en plusieurs ions « fils » permettant, après analyse, l'identification certaine de l'ion précurseur.

Deux types d'analyses sont possible avec cet analyseur, soit une analyse en mode linéaire soit une analyse en mode réflectron (ou réflecteur) (figure 22). Le principe du mode réflectron est d'allonger le temps de vol des ions en appliquant un champs électrique opposé à la trajectoire. Ce mode est particulièrement adapté aux ions de plus faible masse est qui ont donc un temps de vol plus court. Il permet une augmentation importante de la résolution pour obtenir des spectres de masse présentant une résolution isotopique. Cependant, ce mode n'est pas adapté aux ions de masse plus importante. On préférera donc une analyse en mode linéaire pour des protéine ou de peptides de masse importante bien que ce mode ne permette pas une résolution isotopique mais seulement l'obtention de pics correspondant à la masse moyenne d'un peptide.

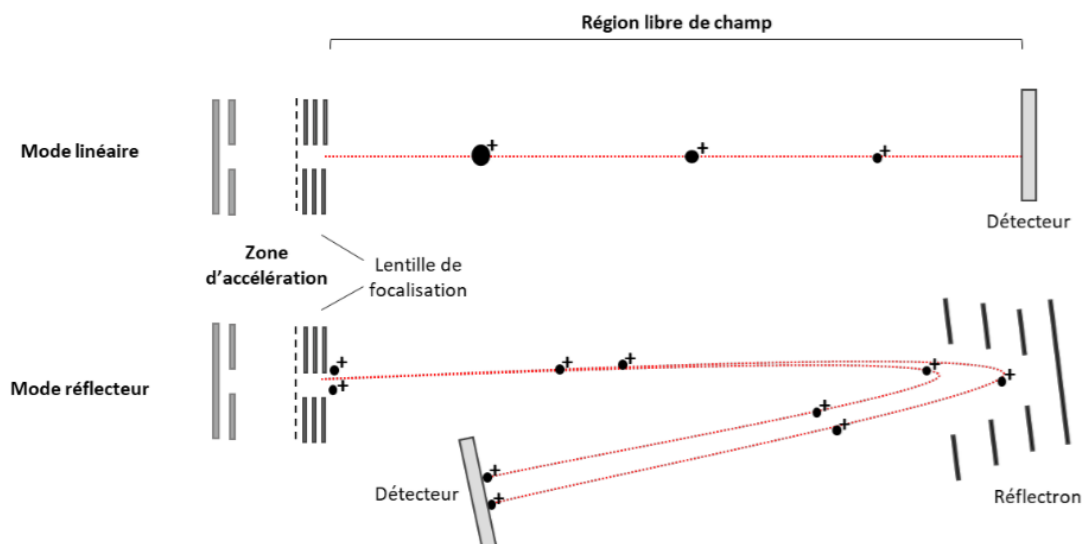


Figure 21 : Principe de l'analyseur de type TOF en mode linéaire ou réflecteur.

Issue de Caroux, 2019.

Nous avons choisi d'utiliser un appareil de type MALDI TOF-TOF car il permet de générer des ions majoritairement mono-chargés facilitant ainsi l'interprétation des spectres, qu'il tolère la présence de certains tampons et sels nécessaires à la formation des différentes souches, et qu'il permet de couvrir une large gamme de rapports masse/charge. De plus, le MALDI-TOF-TOF est compatible avec l'analyse de mélanges peptidiques sans nécessiter de séparation chromatographique préalable. En effet, les échantillons fibrillaires ne peuvent pas subir de séparations chromatographiques à moins d'être totalement solubilisé au risque de boucher la colonne chromatographique. Cependant, un avantage d'utiliser une séparation chromatographique est de pouvoir séparer les peptides isobares (peptides différents de même rapport masse/charge). Dans le cas de l'analyse des fragments protéolytiques générés par protéolyses ménagées, nous visualisons effectivement par MALDI-TOF des pics pouvant correspondre à plusieurs peptides de même masse. Cependant, l'analyse préalable de ces peptides protéolytiques par immunomarquage nous permet d'attribuer un pic à un peptide particulier puisque nous avons des informations concernant la persistance ou non des régions N- ou C-terminale. Un autre inconvénient du MALDI-TOF-TOF est la compétition d'ionisation avec un risque de ne pas ioniser tous les peptides présents. Cependant, aux vues de la faible taille de l'alpha-synucléine (140 acides aminés), le nombre de peptides générés par protéolyse est restreint, limitant également ce phénomène.

Bien que nous n'utilisions donc pas de colonne chromatographique, j'ai du solubiliser les agrégats protéolysés afin d'optimiser l'analyse et de générer des spectres de meilleure qualité. Pour cela, j'ai testé le solvant HFIP (Hexafluoropropan-2-ol), en présence ou non de 1% de SDS puis effectué une centrifugation et enfin vérifié par gel SDS-PAGE la présence des fragments protéolytiques dans le surnageant. Tous les peptides protéolytiques sont observés dans le surnageant après traitement par l'HFIP permettant ainsi une analyse qualitative complète des peptides générés par protéolyse ménagée (figure 22).

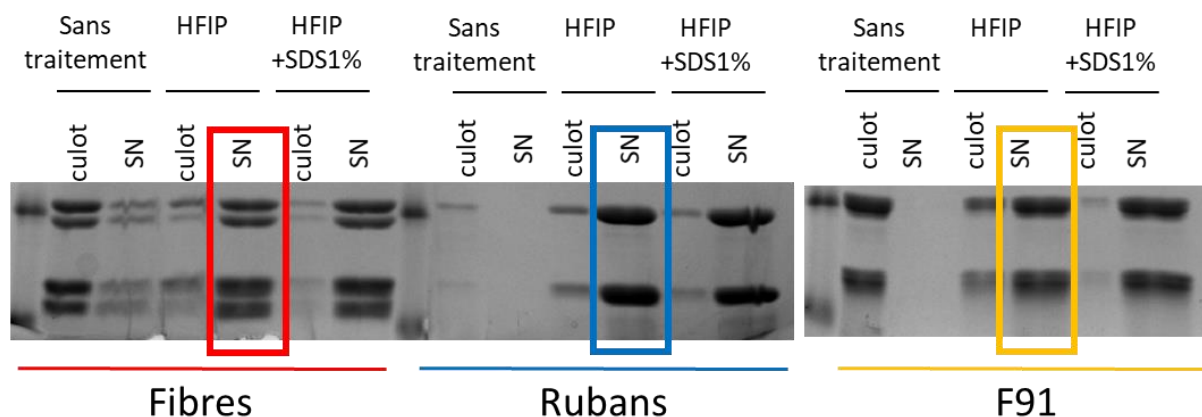


Figure 22 : Solubilisation des souches protéolysées par la thermolysine

Gel SDS-PAGE des fibres, rubans et fibres 91 protéolysés par la thermolysine et centrifugés sans traitement, après traitement par de l'HFIP ou après traitement par de l'HFIP et du SDS 1%.

Identification des produits protéolytiques par spectrométrie de masse

Dans le but de caractériser l'ensemble des peptides générés, j'ai effectué deux types d'analyses dans deux conditions différentes. Cela m'a permis d'analyser d'une part les polypeptides observables sur gel, c'est à dire présentant une masse supérieure à 8000 Da, et d'autre part les peptides de plus faible masse moléculaire, inférieur à 8000Da. Pour pouvoir caractériser les fragments peptidiques de masse moléculaire élevée, j'ai utilisé l'acide sinapinique comme matrice et effectué une analyse en mode linéaire. Comme nous l'avons expliqué précédemment, ces conditions sont adaptées à la détection de peptides de masse élevée mais ne permettent pas une résolution isotopique des peptides présents, seulement l'obtention d'une masse

moyenne moins précise. A la suite de cela, j'ai effectué une analyse grâce au logiciel GPMW permettant de déterminer à quels peptides de l'alpha-synucléine correspond une masse. J'ai considéré les peptides présentant un décalage de masse expérimentale par rapport à la masse théorique de 100ppm (partie par million) au maximum. Puisque la résolution de notre mesure est assez faible, la majorité des pics observés ne peuvent pas être directement attribués à cause de l'existence d'un ou de plusieurs peptides de masse moyenne isobare. J'ai donc combiné les informations obtenues par immuno-marquage avec les résultats de spectrométrie de masse afin de pouvoir identifier avec certitude les peptides présents. Par exemple, le pic de masse 12705.4 a une masse compatible avec le peptide 1-125 (décalage de masse : 0ppm) ou 9-133 (décalage de masse : 62ppm). Or, ce pic intense a une masse correspondant à un peptide fortement abondant visualisé sur gel qui est reconnu par l'anticorps ASyM (1-15) mais qui n'est pas reconnu par l'anticorps 10D2 (118-127) indiquant une troncation de l'extrémité C-terminale et une persistance de l'extrémité N-terminale. Nous en déduisons donc que ce pic correspond au peptide 1-125.

L'analyse des fragments de plus faible masse moléculaire, inférieure à 8000 Da, est cette fois effectuée avec une matrice HCCA (4-hydroxy- α -cyanocinnamic acid) et en mode réflecteur puisque ces conditions sont compatibles avec la taille des peptides et permettent une bonne résolution isotopique et une meilleure précision des mesures masse/charge. J'ai ainsi pu assigner avec certitude les fragments présents. Cette analyse a permis d'identifier les petits fragments complémentaires des peptides identifiés précédemment en mode linéaire (par exemple, le peptide 112-140 de masse monoisotopique $MH^+ 3375.36$ Da est complémentaire du polypeptide 1-111 de masse moyenne $MH^+ 11102.65$ Da). L'identification de ces petits peptides a permis de confirmer sans ambiguïté l'identification des fragments de masse plus importante. La stratégie d'analyse de ces deux types de fragments est illustrée par la figure 23.

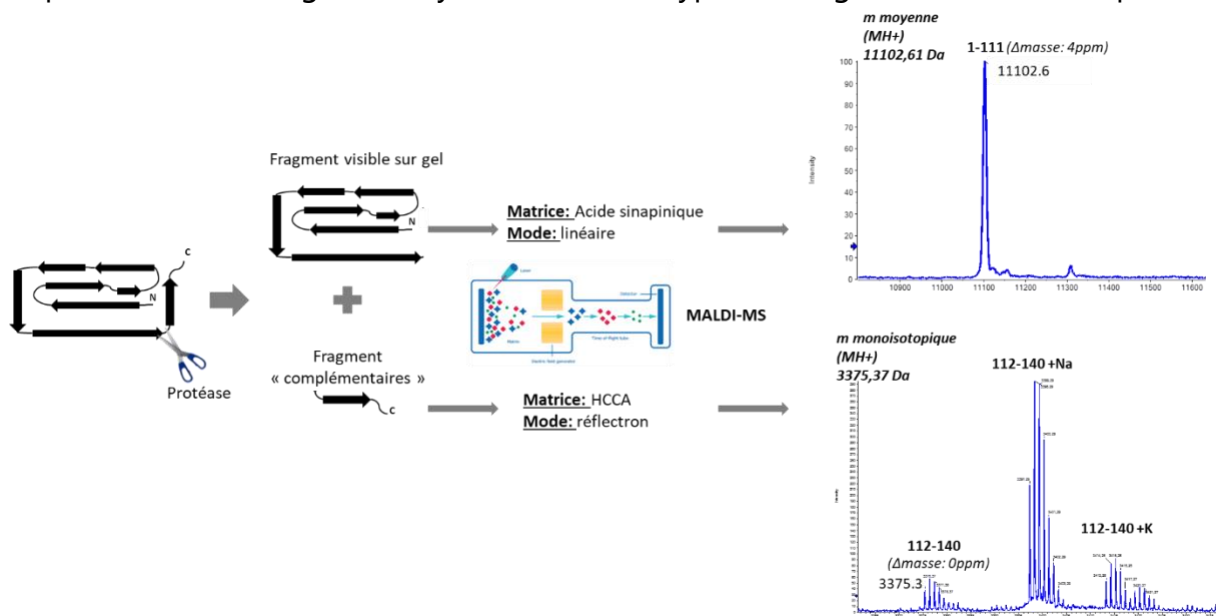


Figure 23 : Analyse MS des fragments protéolytiques

Analyse des peptides 1-111 et 112-140 générés par la protéolyse ménagée des rubans pendant 15 minutes par la thermolysine. La protéolyse ménagée génère deux types de fragments : des fragments présentant des masses moléculaires élevées et des fragments complémentaires plus légers. Les gros fragments polypeptidiques sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF dans une matrice d'acide sinapinique en mode linéaire, permettant l'obtention d'un spectre présentant la masse moyenne du peptide (ici, le peptide 1-111 de masse moyenne expérimentale $MH^+ 11\ 102,61$ Da pour une masse théorique $11\ 102,65$ Da). Les fragments légers sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF dans une matrice d'HCCA en mode réflectron, permettant l'obtention d'un spectre présentant la masse monoisotopique du peptide (ici, le peptide 112-140 de masse monoisotopique expérimentale $MH^+ 3\ 375,37$ Da pour une masse théorique de $3\ 374,36$ Da).

La combinaison des résultats obtenus par immuno-marquage et par spectrométrie de masse m'a permis d'identifier les peptides protéolytiques générés par protéolyse ménagée par la protéinase K et la thermolysine. J'ai ainsi défini des régions de surface des souches d'alpha-synucléine.

b. Cartographie des surfaces par échanges hydrogène-deutérium

Afin de confirmer la cartographie des surfaces accessibles des différentes souches d'alpha-synucléine obtenues par les protéolyses ménagées, j'ai mis en œuvre des expériences d'échanges hydrogène-deutérium couplées à une analyse par spectrométrie de masse.

Principe des échanges HDX mesuré par MS

La méthode des échanges hydrogène-deutérium est basée sur le fait que les hydrogènes labiles d'une protéine s'échangent constamment avec les hydrogènes présents dans le solvant. Par conséquent, si l'environnement de ces protéines est composé d'un solvant deutéré, les hydrogènes vont s'échanger avec les deutériums (isotopes lourds de l'hydrogène) de l'environnement. L'incorporation de deutérium entraîne alors une augmentation de la masse de

la protéine d'un dalton par hydrogène échangé mesurable par spectrométrie de masse (*Tsiatsiani et al., 2017, Pirrone et al., 2017*). Les régions enfouies de la protéine, qui ne sont pas ou peu accessibles au solvant, ont des vitesses et des taux d'échanges beaucoup plus faibles que les régions exposées au solvant, accessibles, à la surface de la protéine. Également, les régions structurées échangeront moins et moins rapidement que les régions non structurées. L'étude du taux d'échange apporte donc des informations sur l'organisation spatiale de la protéine, en particulier sur l'accessibilité au solvant des hydrogènes amidiques (*Zhang and Smith, 1993, Jacob and Engen, 2012*).

En effet, l'échange des hydrogènes des chaînes latérales des acides-aminés est extrêmement rapide (de l'ordre de la milliseconde) et n'est donc pas mesurable par spectrométrie de masse, compte-tenu du fait que les ré-échanges des deutériums incorporés est également extrêmement rapide. Les hydrogènes liés de manière covalente aux carbones alpha des protéines ne s'échangent pas ou extrêmement lentement, et ne sont donc pas mesurés non plus lors des expériences d'échange hydrogène-deutériums. En revanche, l'échange des hydrogènes amidiques des liaisons peptidiques se fait à une vitesse analysable (plusieurs minutes) qui peut de surcroît être considérablement ralentie à pH acide (pH entre 2 et 3) et à froid (0°C) pour que les échanges de ces hydrogènes soient mesurables par spectrométrie de masse (*Bai et al., 1993, Walters et al., 2012*). En effet, la diminution d'une unité de pH diminue la vitesse d'échange d'un facteur 10, la diminution de la température de 10°C diminue la vitesse d'échange d'un facteur 4 (figure 24). Les expériences d'échanges hydrogène-deutérium mesurés par spectrométrie de masse (HDX) vont donc mesurer les taux d'échange, et l'accessibilité de ces hydrogènes amidiques des liaisons peptidiques.

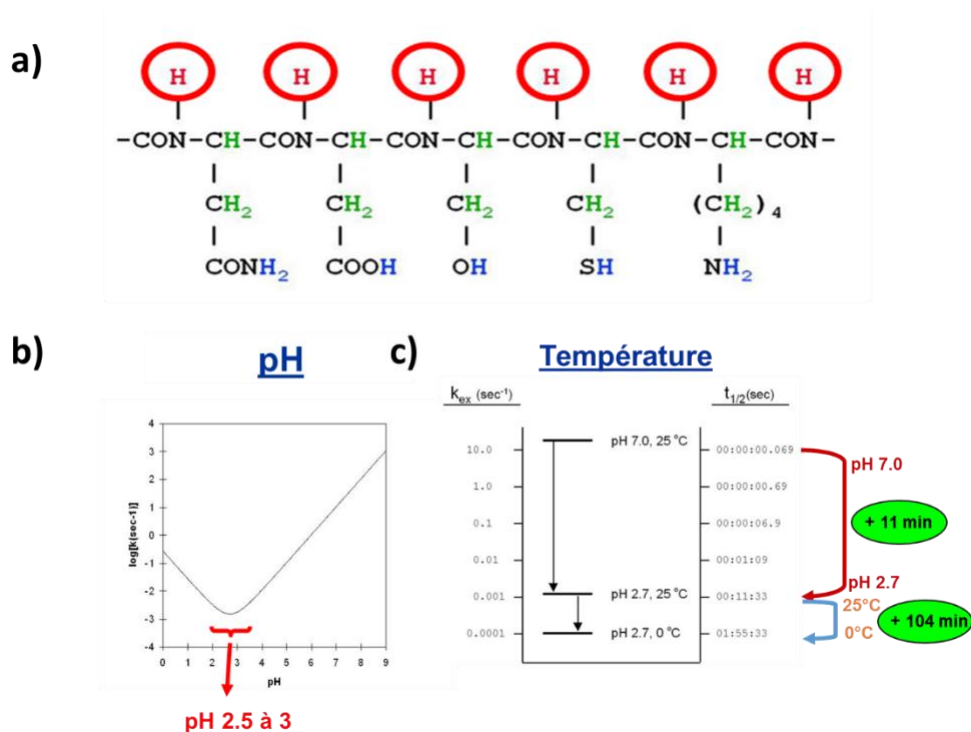


Figure 24 : Hydrogènes analysables par HDX et influence de la température et du pH

Les hydrogènes des chaînes latérales sont représentés en bleu, les hydrogènes covalents en vert et les hydrogènes amidiques, dont la vitesse d'échange avec les deutérium du milieu est compatible avec une analyse par MS, sont représentés en rouge (a). Influence du pH (b) et de la température (c) sur la vitesse d'échange hydrogène-deutérium.

L'analyse du taux d'échange au niveau protéique informe donc sur le niveau global de structuration d'une protéine et permet de suivre des changements conformationnels à l'échelle de la protéine. Dans le cadre de ce travail, j'ai cherché à localiser les échanges HDX au niveau moléculaire, le long de la séquence de l'alpha-synucléine, pour compléter et augmenter la résolution de la cartographie des surfaces accessibles des souches d'alpha-synucléine. La figure 25 décrit le principe de cette approche HDX combinée à une analyse des protéines par des méthodes protéomiques qui intègrent un arrêt des échanges, une digestion ultra-rapide des protéines d'intérêt, et une analyse également ultra-rapide des peptides protéolytiques par spectrométrie de masse dans le but de mesurer le taux d'échange de chaque peptide protéolytique.

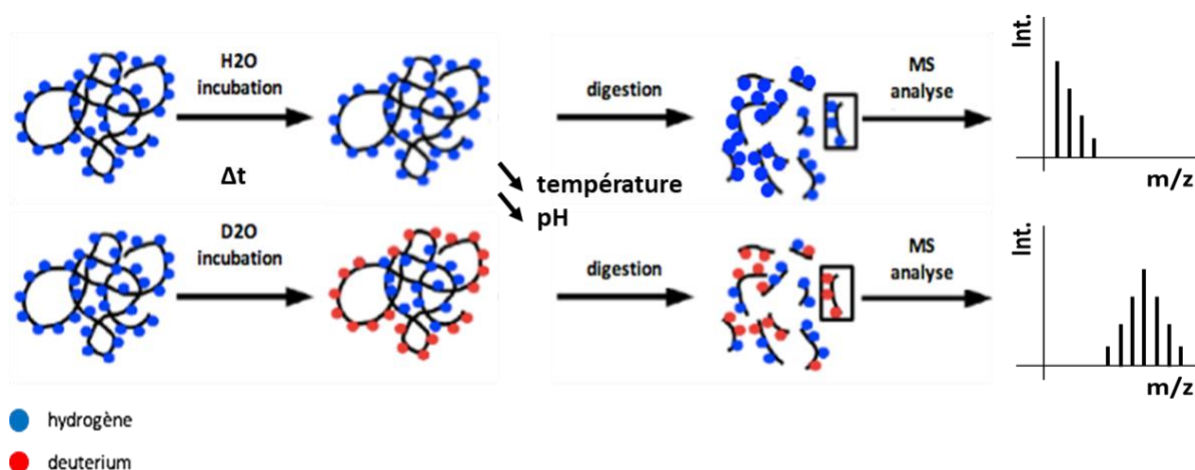


Figure 25: Les échanges hydrogène-deutérium

Modifiée de Coufalova et al., 2015. Schématisation des différentes étapes des expériences d'échange hydrogène/ deutérium.

Principales étapes d'une approche HDX-MS

D'un point de vue expérimental, les étapes majeures de cette technique sont décrites ci-dessous. La méthodologie appliquée a été adaptée de *Redeker et al., 2007 et de Nazabal et al., 2006*.

(1) Les échantillons étudiés sont incubés dans un tampon deutéré D2O pendant différents temps (2, 30 ou 120 minutes) afin de déterminer une cinétique d'échange.

(2) La réaction d'échange est ensuite ralentie au maximum par diminution de la température (incubation dans de la glace mouillée) et du pH (ajout d'acide formique 3%), c'est une étape dite de « quenching ». En effet, comme expliqué précédemment, le pH et la température influencent fortement la vitesse d'échange (figure 24). La température est donc réduite à 0°C et le pH diminué à 2.5 afin de « figer » la réaction.

(3) Les échantillons sont rapidement digérés grâce à la pepsine. Cette enzyme est habituellement utilisée pour les échanges hydrogène-deutérium car elle est active à pH acide et à froid. Deux autres enzymes, *Rhizopus species* et *Aspergillus saitoi*, actives dans des conditions compatibles avec les échanges hydrogène-deutérium, peuvent également être utilisées (*Forest et Rey, 2016*).

(4) Les échantillons digérés sont ensuite analysés par spectrométrie de masse MALDI-MS ou LC-ESI-MS (liquid-chromatography electrospray ionization mass spectrometry) . Lors d'une

analyse MALDI, le dépôt doit être séché rapidement, de préférence sous flux d'azote avant une analyse en mode réflectron. Lors d'une analyse LC-ESI-MS, la séparation chromatographique est une séparation rapide, généralement à micro-débit et toujours avec une colonne de phase inverse réfrigérée.

L'ensemble de la manipulation doit être effectuée le plus rapidement possible afin de diminuer au maximum le phénomène de rétro-échange des deutériums incorporés avec les hydrogènes du tampon. En effet, toutes les étapes suivant l'incubation dans du deutérium s'effectuent en présence de tampons contenant des hydrogènes. De la même manière que les hydrogènes peuvent s'échanger avec les deutériums du milieu, les deutériums incorporés peuvent se ré-échanger avec les hydrogènes du milieu entraînant une perte d'information significative. Le maintien d'une température à 0°C, d'un pH acide et la rapidité d'exécution de la manipulation limite grandement ce phénomène.

Mises au point de l'analyse HDX d'agrégats d'alpha-synucléine

Un grand nombre de mises au point ont été nécessaires afin d'effectuer une analyse des échanges hydrogène-deutérium par spectrométrie de masse des souches d'alpha-synucléine. Le premier choix à faire est celui de type de spectromètre utilisé pour l'analyse. Les études les plus récentes utilisent majoritairement des appareils de type LC-ESI-MS/MS et généralement des systèmes automatisés garantissant une forte reproductibilité des résultats (*O'Brien et al., 2017, Ruttkies C., 2019*). L'avantage de ce type d'analyse est une augmentation conséquente de la sensibilité permettant la visualisation d'un plus grand nombre de peptides et donc une augmentation de la résolution (meilleur recouvrement de séquence et présence de multiples peptides chevauchants) ainsi qu'une diminution du rétro-échange par rapport à une analyse par MALDI-MS. De plus, la fragmentation MS/MS permet une identification fiable et directe des peptides. Cependant, la nature fibrillaire de nos échantillons complique considérablement l'utilisation de ce type de méthodologie. En effet, la séparation chromatographique (LC) nécessite que les échantillons soient entièrement dissociés, toujours à froid, et dans un temps limité, pour ne pas risquer de boucher la colonne chromatographique. Certaines études portant sur l'analyse HDX d'assemblages fibrillaire protéiques ont donc utilisé l'une ou l'autre de ces deux méthodologies (*Illes-Toth et al., 2018, Redeker et al., 2007*). A cause de ces complications et du fait que l'alpha-synucléine est une petite protéine (140 acides-aminés) limitant ainsi les phénomènes de compétition d'ionisation et l'existence de peptides isobares, l'utilisation, dans un premier temps, du MALDI-TOF-TOF, en mode linéaire afin d'optimiser la précision de masse

obtenue, pour l'étude des échange hydrogène-deutérium d'assemblages protéiques nous a semblé plus appropriée. Parallèlement, nous avons également confirmé l'identification des peptides observés en MALDI-MS par fragmentation (MALDI-MS/MS et LC-ESI MS/MS).

Optimisation des conditions de digestion

Comme nous l'avons expliqué, l'expérience d'HDX doit être réalisée dans un temps très court pour limiter au maximum le phénomène de rétro-échange. Cela implique que la digestion de nos échantillons par la pepsine doit être réalisée en quelques minutes au maximum. Etant donné que nos échantillons sont de nature fibrillaire, cette digestion totale et rapide est délicate. La digestion des échantillons par la pepsine a donc nécessité des étapes importantes d'optimisation du ratio enzyme : substrat afin d'obtenir une digestion totale des formes agrégées de l'alpha-synucléine dans un temps court, c'est-à-dire 2 minutes. La digestion totale de nos échantillons a été contrôlée et optimisée par SDS-PAGE et par dot blot (figure 26). J'ai donc vérifié la persistance de formes entière de l'alpha-synucléine après une digestion des rubans, souche la plus résistante à la protéolyse, par la pepsine pendant 2 minutes aux ratios pepsine : alpha-synucléine (masse : masse) 10 :1, 50 :1 et 100 :1. Les résultats du gel SDS-PAGE montrent une très légère persistance d'alpha-synucléine entière aux ratios 10 :1 et 50 :1 bien que le dot blot ne montrent plus de marquage de l'alpha-synucléine à partir du ratio 50 :1. Nous avons donc préféré digérer les souches d'alpha-synucléine à un ratio pepsine : alpha-synucléine de 100 :1 (masse : masse) pendant 2 minutes car ce ratio assure une digestion totale de nos échantillons et génère un grand nombre de peptides.

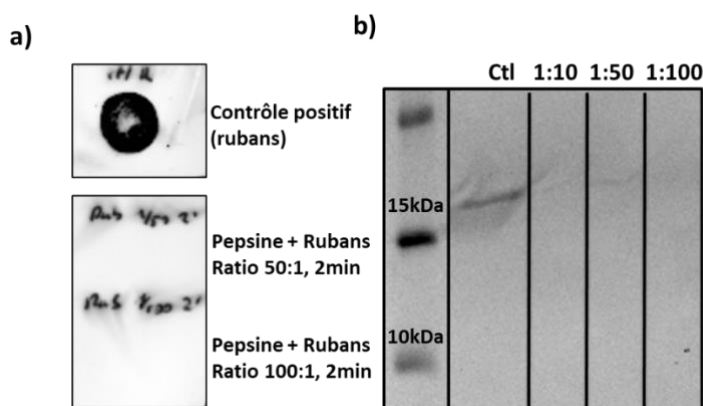


Figure 26: Optimisation de la digestion des souches d'alpha-synucléine par la pepsine

Contrôle par dot blot (a) et par SDS-PAGE (b) de la digestion totale des rubans d'alpha-synucléine par la pepsine après 2 minutes aux ratios 10 :1, 50 :1, 100 :1.

En effet, une autre mise au point importante est l'optimisation du recouvrement de séquence des peptides digérés. Cette optimisation est largement liée à l'enzyme utilisée et aux conditions de digestion et d'analyse. Nous avons donc analysé les peptides présents dans nos échantillons digérés par la pepsine par spectrométrie de masse LC-ESI MS/MS, c'est-à-dire que les peptides ont été séparés par chromatographie et analysés après fragmentation. L'identification des peptides présents a été effectuée grâce au logiciel MASCOT. J'ai ensuite effectué des analyses MALDI-MS de ces même échantillons protéolysés afin de vérifier les peptides visualisables (intensité suffisante, spectre suffisamment isolé pour mesurer un décalage de masse après HDX) et j'ai obtenu un recouvrement de séquence 94% mais avec peu de peptides chevauchants (figure 27 a). Il est à noter que les peptides pepsiques détectés par MALDI-MS, sont majoritairement des peptides présentant un adduit de sodium. Ces adduits de sodium restent abondants, en particulier pour les peptides acides du C-terminal de l'alpha-synucléine, malgré une étape de dé-salage par zip-tip. Ce phénomène est lié d'une part à la présence de sodium dans les tampons utilisés et d'autre part à la présence de nombreux acides aminés acides dans l'ensemble de la séquence de l'alpha-synucléine, avec une concentration plus forte dans l'extrémité C-terminale de l'alpha-synucléine. Ainsi, la forme chargée négativement du radical de l'acide glutamique ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$) présente à pH neutre (pendant l'étape d'incubation dans du D_2O) est neutralisée pendant l'étape de quenching qui diminue le pH du milieu à 2.5 ($\text{pH} < \text{point isoélectrique du glutamate} : 3.2$). A cette étape, les ions sodium Na^+ des tampons utilisés peuvent favoriser la formation d'adduits sodés. Egalement, lors du processus d'ionisation/ désorption MALDI qui consiste à transférer des protons H^+ de la matrice aux analytes à ioniser, des transferts d'ions Na^+ présents dans l'échantillon, co-cristallisés avec l'échantillon et la matrice, peuvent également se produire (*Vinh et al., 1997*).

Compte-tenu de l'intensité beaucoup plus importante des peptides sodés par rapport aux peptides non sodés, de l'augmentation des retro-échanges par des étapes trop longues de dé-salage et de l'impossibilité d'éliminer totalement les adduits de sodium, en particulier pour les peptides acides du C-terminal de l'alpha-synucléine, l'ensemble de l'analyse HDX a été réalisée sur les peptides sodés. Avant de mener l'analyse, nous avons pris soin de vérifier l'identité des peptides sodés par fragmentation en MALDI-MSMS. De cette manière, j'ai pu assigner avec certitude les massifs isotopiques à un peptide unique. Il est à noter que même si les vitesses ou efficacité d'échanges peuvent être ralenties par la formation de ponts salins en présence de sodium (*Chen et al, 2015*), les analyses d'échanges HDX qui consistent à comparer les taux d'échanges entre les peptides pepsiques générés des assemblages d'alpha-synucléine et ceux générés à partir des monomères restent tout à fait possible.

Bien que le recouvrement de séquence obtenu soit proche de 100%, nous avons voulu améliorer la précision des informations en essayant de générer plus de peptides chevauchants. J'ai donc commencé des mises au point de digestion avec deux autres enzymes actives à pH acide ; *Aspergillus Saitoi* (Asp, figure 27 c) et *Rhizopodes* sp. (*Zhang et al., 2008*). Cependant, en raison des circonstances particulières de la fin de cette thèse liées au confinement, j'ai n'ai pas pu terminer cette optimisation.

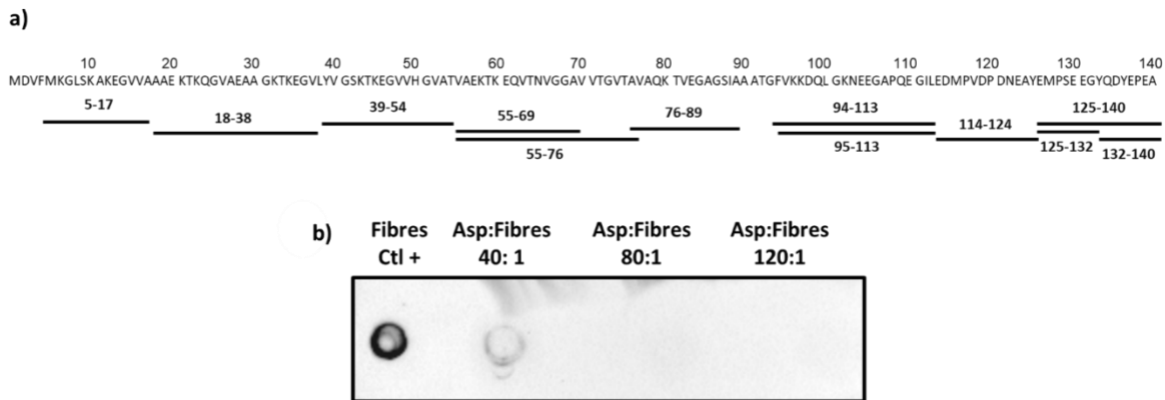


Figure 27: Recouvrement de séquence

Recouvrement de séquence des monomères et souches d'alpha-synucléine digérés par la pepsine pendant 2 minutes à un ratio pepsine : alpha-synucléine (masse : masse) 100 :1 (a). Dot blot des mises au point de la digestion pendant 2 minutes des fibres d'alpha-synucléine par *Aspergillus Saitoi* (Asp) aux ratios 40 :1, 80 :1 et 120 :1 (b).

Les autres optimisations majeures concernent le contrôle des conditions expérimentale : contrôle du pH, contrôle de la température et rapidité d'exécution de l'expérience afin de limiter le phénomène de rétro-échange. L'ensemble des étapes suivant l'incubation des échantillons dans du D₂O, y compris la protéolyse par la pepsine de 2 minutes et l'acquisition des spectres, ont été réalisées en moins de 5 minutes. La nécessité de travailler dans un temps très court est également la raison pour laquelle les échantillons sont séchés sous flux d'azote à la suite de leur dépôt sur plaque. Différentes manières de sécher les échantillons (en soufflant, sous flux d'air, sous flux d'azote) ont d'ailleurs été testées. Enfin, nous avons ajouté une étape rapide de dé-salage sur zip-tip C18 avant le dépôt sur plaque MALDI. Ce dé-salage, bien qu'ayant une efficacité réduite à cause de sa rapidité d'exécution, a permis de limiter l'apparition de peptides bi- ou tri-sodés. La comparaison des spectres obtenus avec et sans dé-salage montre également

que cette étape permet de diminuer significativement le bruit de fond observé sur nos spectres et donc d'augmenter le rapport signal/bruit.

Calcul du rétro-échange et mesure du taux d'échange

Afin de calculer le rétro-échange moyen de l'expérience, j'ai incubé des monomères d'alpha-synucléine protéolysés par la pepsine pendant 48h dans du D₂O et j'ai ensuite calculé le nombre d'hydrogènes échangés par peptide. La différence entre le nombre d'hydrogènes théoriquement échangeables (c'est-à-dire un hydrogène par liaison peptidique à l'exception des prolines) et le nombre d'hydrogènes expérimentalement échangés correspond au rétro-échange. Nous avons obtenu un rétro-échange moyen de 43%. Les publications traitant des échanges hydrogène/deutérium analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF montrent généralement un rétro-échange de l'ordre de 40 à 50% (*Pirrone et al., 2017, Mandell et al., 1998*).

A la suite de ce calcul, j'ai donc analysé les résultats des échanges HDX obtenus après incubation des monomères ou des souches d'alpha-synucléine dans du D₂O. J'ai tout d'abord analysé la réaction d'échange au cours du temps des monomères d'alpha-synucléine. Puisque ces monomères ne sont en théorie pas structurés, ils devraient atteindre un niveau d'échange hydrogène/deutérium maximal très rapidement. En effet, j'observe qu'après seulement 2 minutes d'incubation dans du deutérium les monomères atteignent un pourcentage d'échange presque équivalent à celui obtenu après 2h d'incubation (figure 28 a).

J'ai donc ensuite effectué des expérimentations d'échange hydrogène/ deutérium après 2 minutes, 30 minutes ou 2 heures d'incubation dans du D₂O des monomères ou des différentes souches partiellement agrégées. Cela m'a permis d'obtenir une cartographie précise des régions accessibles ou enfouies des différentes souches d'alpha-synucléine. A noter que j'ai étudié des souches seulement partiellement agrégées afin d'obtenir un contrôle interne (deuxième groupement de pics sur la figure 25 b) dans mes mesures, correspondant aux formes monomériques qui persistent dans l'échantillon. La figure 25 présente les spectres de masse obtenus après incubation des monomères ou des fibres dans du D₂O pour le peptide 39-54 ainsi que la cinétique correspondante pour les monomères et les 3 souches étudiées. Les cinétiques des peptides étudiés sont disponibles en annexe 1 du chapitre 3 résultats, partie 1.

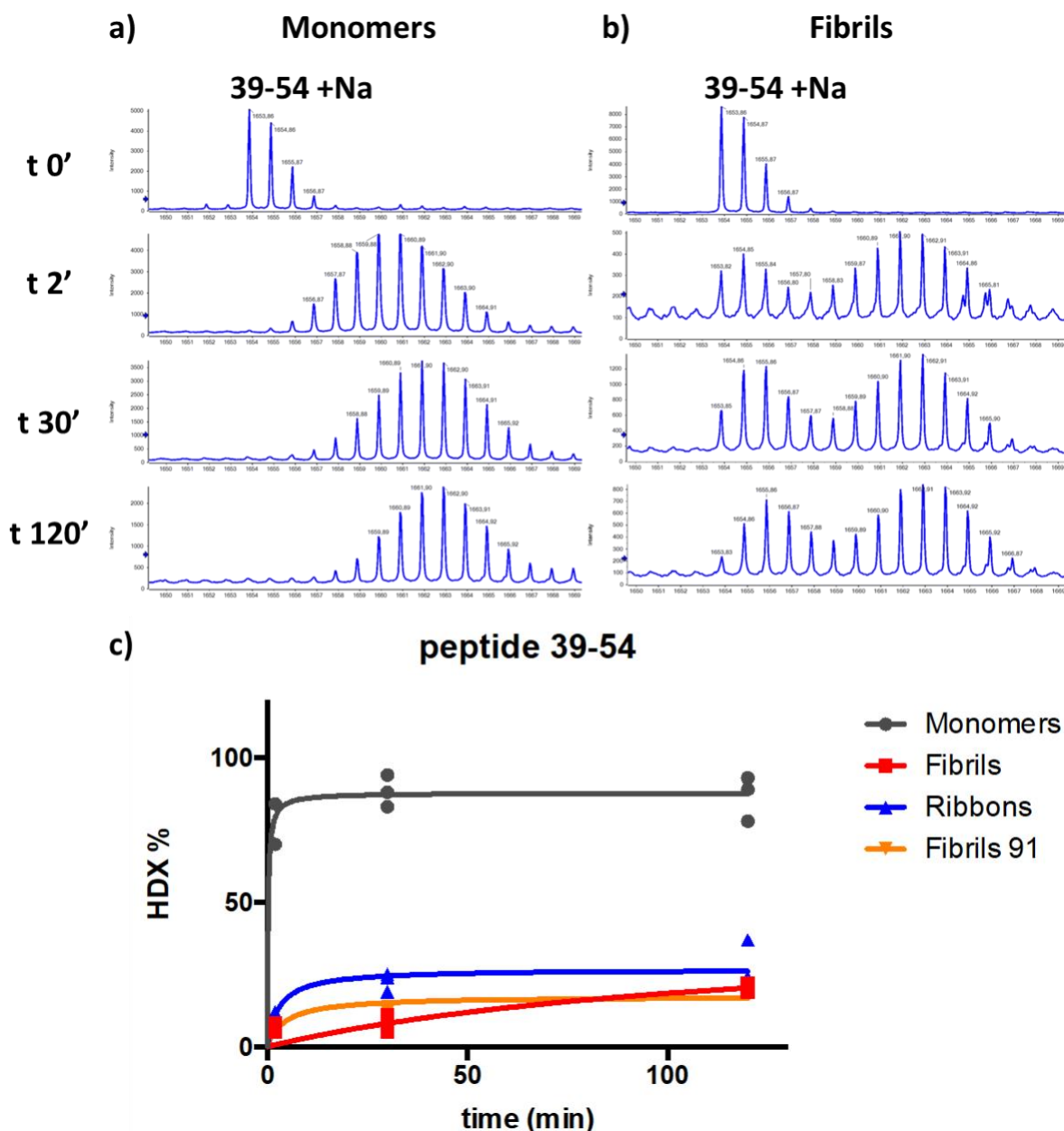


Figure 28: Cinétique des échanges hydrogène-deutérium du peptide 39-54

Spectres de masse de l'évolution en fonction du temps d'incubation dans du D_2O des échanges hydrogène-deutérium du peptide 39-54 (avec un adduit de sodium) des monomères (a) et des fibres partiellement agrégées (b) après 2, 30, ou 120 minutes d'incubation dans du deutérium. Représentation de la cinétique des échanges hydrogène-deutérium du peptide 39-54 pour les monomères (en gris) ou les fibres (en rouge), les rubans (en bleu) et les fibres 91 (en orange) au cours du temps (c).

Bien que délicate à mettre en place, la technique des échanges hydrogène-deutérium combinée à la spectrométrie de masse apporte des informations structurales précieuses sur les séquences protéiques exposées ou non au solvant. Cette approche s'avère être un outil puissant et précis pour la détermination de la surface d'agrégats protéiques. L'optimisation de différentes étapes m'a permis de compléter et de préciser les segments peptidiques exposés à la surface des souches d'alpha-synucléine déterminés par protéolyses ménagées.

c. Discrimination des souches par accessibilité des anticorps

La dernière approche que j'ai utilisée pour déterminer la surface accessible des souches d'alpha-synucléine est l'immuno-marquage des agrégats non dénaturés par dot blot. J'ai donc déposé sur une membrane les différentes souches d'alpha-synucléine sans dénaturation et j'ai exposé cette membrane à plusieurs anticorps monoclonaux décrits précédemment (ASYM, Syn1, 10D2). Puisque les agrégats ne sont pas dénaturés, les anticorps peuvent accéder uniquement aux régions exposées à la surface des souches. Cette technique à l'avantage de discriminer les différentes souches d'alpha-synucléine de manière extrêmement simple et rapide. De plus, elle permet d'analyser si les différences de surface des souches sont suffisantes pour induire des différences d'accessibilité par les anticorps.

Puisque l'objectif final de notre thèse est de pouvoir, à long terme, générer des molécules capables de discriminer et/ou de ralentir spécifiquement la propagation des souches d'alpha-synucléine, cette expérience nous permet d'apporter une preuve que des anticorps peuvent discriminer et cibler spécifiquement de manière simple et fiable certains types d'agrégats d'alpha-synucléine. Il est évident que cette méthodologie doit cependant faire ses preuves in vivo avant de pouvoir envisager une application diagnostic ou thérapeutique.

3. Etude de la clairance des souches in cellulo

La seconde partie de cette thèse a pour objectif de déterminer si les régions des souches d'alpha-synucléine accessibles *in vitro* restent accessibles *in vivo*. Pour cela j'ai étudié la dégradation de ces souches par des cultures primaires d'astrocytes et de neurones corticaux de

rats. En effet, la dégradation des souches d'alpha-synucléine par les protéases cellulaires peut être assimilée à une « protéolyse ménagée en condition physiologique ». De la même manière que pour les expériences de protéolyse ménagée *in vitro*, j'ai utilisé des anticorps monoclonaux afin de déterminer les peptides d'alpha-synucléine tronqués par les neurones ou les astrocytes. J'ai également étudié la cinétique de dégradation ainsi que l'internalisation des souches par ces deux types cellulaires afin de déterminer si les différences de surface entraînent des caractéristiques fonctionnelles différentes. Les différences de surface des souches pourraient par exemple influencer leurs liaisons avec des partenaires protéiques ou lipidiques impliqués dans leur internalisation par les cellules.

J'ai choisi d'étudier la dégradation et l'internalisation des souches d'alpha-synucléine par deux types de cultures primaires ; les neurones et les astrocytes. En effet, l'alpha-synucléine est exprimée majoritairement dans le cerveau par les neurones et la plus grande partie des agrégats présents dans le cerveau des patients atteints de synucléinopathies est retrouvée dans les neurones (*Goedert et al., 1998*). Il apparaît donc cohérent d'étudier ce type cellulaire. Cependant, des agrégats d'alpha-synucléine sont également retrouvés en quantité non négligeable dans les astrocytes, en particulier chez les patients atteints de la maladie de Parkinson ou de démences à corps de Lewy (*Song et al., 2009, Sorrentino et al., 2019*). De plus, il a été montré que les astrocytes, correspondant au type cellulaire le plus abondant dans le cerveau, sont capables de dégrader les agrégats d'alpha-synucléine (*Loria et al., 2017, Lee et al., 2008*). Il semblerait même que les neurones transfèrent leurs agrégats d'alpha-synucléine aux astrocytes afin qu'ils soient dégradés (*Loria et al., 2017*). Il est donc également très intéressant d'étudier ce type cellulaire. Il aurait également été intéressant d'étudier la dégradation et l'internalisation des souches d'alpha-synucléine par des cultures primaires d'oligodendrocytes qui présentent des agrégats d'alpha-synucléine chez les patients atteints de MSA. Cependant, ce type cellulaire est techniquement plus complexe à obtenir sous forme de culture pures et aurait nécessité des mises au point trop importantes pour pouvoir être développé au cours de cette thèse.

Mise au point de cultures primaires pures d'astrocytes et de neurones

J'ai donc mis en place des cultures primaires corticales pures d'astrocytes et de neurones. Les cultures sont effectuées à partir d'embryons de rats de 18 jours (E18). Bien que la culture

primaire des astrocytes soit plus habituellement effectuée en *post natal* car les astrocytes sont alors plus abondants (*Schildge et al., 2013*), elle reste possible à E18 et nous permet d'effectuer des cultures primaires d'astrocytes et de neurones à partir du cortex cérébral de mêmes embryons, dans les mêmes conditions, donnant ainsi des résultats comparables.

Les astrocytes sont cultivés en présence de sérum de cheval. La quantité importante de glutamate apporté par ce sérum permet de tuer les neurones présents (*Ye et Sontheimer, 1998*). Des agitations manuelles juste avant le changement du milieu de culture sont effectuées à DIV (Day In Vitro) 7 et DIV12 et entraînent l'élimination des débris résiduels de neurones ainsi que de la microglie. J'ai ainsi obtenu des cultures corticales d'astrocytes pures dont la morphologie a été contrôlée par microscopie (figure 29).

Les neurones sont cultivés dans un milieu conditionné par des astrocytes afin de permettre leur développement. De l'AraC (cytarabine), un inhibiteur de la division cellulaire, est ajouté à ce milieu afin d'empêcher la division des astrocytes et d'obtenir une culture pure de neurones. Plusieurs mises au point ont été nécessaires afin d'obtenir des cultures primaires de neurones pures et de les maintenir vivantes pendant au moins deux semaines (test de différents milieux de culture, optimisation de la quantité de cellule, optimisation de la quantité d'Ara-c). Le milieu de culture finalement choisi est composé de 50% de « milieu neuronal conditionné » (glutamax, neurobasal medium et B27 préalablement incubés pendant plusieurs jours avec des astrocytes) et 50% de « brain phys » supplémenté par du SM1, qui permet une meilleure survie cellulaire ainsi qu'une amélioration de l'activité synaptique (*Bardy et al., 2014*). La morphologie des neurones a également été contrôlée par microscopie (figure 29).

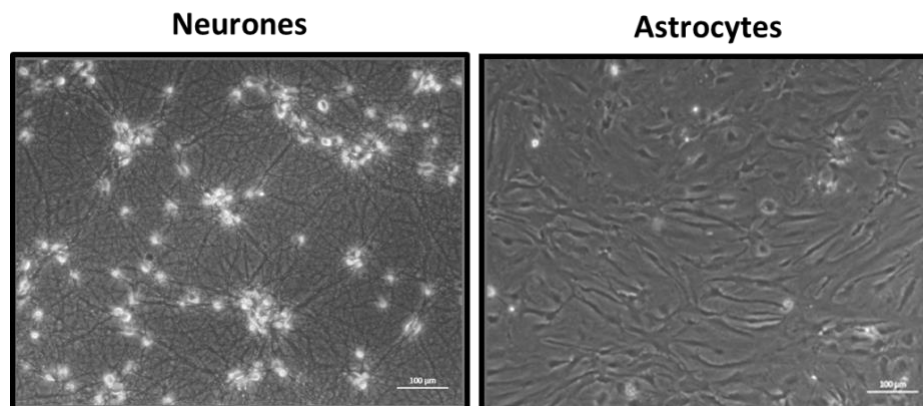


Figure 29 : Morphologie des neurones et des astrocytes à DIV13

Images de microscopie des cultures primaires de neurones (à gauche) et d'astrocytes (à droite) corticaux de rat après 13 jours de culture, bar d'échelle : 100µm.

Exposition des cultures primaires aux monomères et souches d'alpha-synucléine

Les cellules que j'ai produites ont été exposées, après 13 jours de culture, à 1uM d'alpha-synucléine (monomérique ou agrégée) durant 2 heures. A ce stade de développement, les neurones présentent des synapses formées et les astrocytes sont considérés comme matures (*Ichikawa et al., 1993*).

J'ai effectué plusieurs tests en exposant les neurones et les astrocytes à différentes quantités d'alpha-synucléine (0.5uM, 1uM, 5uM). J'ai finalement choisi d'exposer les cellules à 1uM d'alpha-synucléine. En effet, c'est la concentration minimale nécessaire pour pouvoir effectuer des analyses d'immuno-marquage par western-blot et visualiser correctement l'alpha-synucléine internalisée.

Le temps 2 heures a été déterminé car il est largement suffisant pour permettre une internalisation maximum des souches par les cellules (qui est de l'ordre de 15 minutes) (*Pieri et al., 2016, Shrivastava et al., 2020*). J'ai retiré les agrégats d'alpha-synucleine qui n'ont pas été internalisés en changeant le milieu de culture après 2 heures d'exposition afin d'étudier uniquement l'alpha-synucléine prise en charge par les cellules (et pas l'alpha-synucléine extracellulaire).

J'ai ensuite étudié la dégradation des différentes formes d'alpha-synucléine par les neurones et les astrocytes après 2h d'exposition et 0, 24 ou 48 heures de prise en charge par les cellules. Pour cela, j'ai récupéré les cellules (0, 24 ou 48 heures après leur exposition à l'alpha-synucléine) et les ai lysées en présence de tampon RIPA (Tris pH7.5, NaCl, EDTA, Sodium Déoxycholate, Triton, SDS). La quantité de protéine présente dans les échantillons est contrôlée par un test BCA (BiCinchoninic acid Assay). Les échantillons sont ensuite asséchés au speed Vac et solubilisés grâce au solvant HFIP. En effet, comme il a été expliqué précédemment, cette solubilisation permet aux souches d'alpha-synucléine de pouvoir pénétrer totalement dans le gel. Les extraits cellulaires ont finalement été migrés sur gel et l'alpha-synucléine présente a été identifiée par immuno-marquage grâce à l'anticorps 4B12 permettant la reconnaissance de l'alpha-synucléine humaine ajoutée à mes cultures. L'identification des formes tronquées de l'alpha-synucléine a été effectué grâce aux anticorps monoclonaux précédemment décrits ASym (1-15), Syn1 (91-99) et 10D2 (118-127).

Parallèlement, j'ai également étudié l'internalisation de ces souches d'alpha-synucléine par les neurones. Pour cela, j'ai utilisé la technique d'immuno-marquage par western-blot. L'immuno-marquage a été effectué comme décrit précédemment après avoir exposé les cellules à l'alpha-

synucléine pendant 2 heures. J'ai également vérifié l'internalisation des souches d'alpha-synucléine après seulement 20 minutes d'exposition afin de confirmer que les résultats obtenus n'étaient pas dus, en partie, à une dégradation précoce de l'alpha-synucléine et j'ai obtenu des résultats identiques à ceux observés après 2h d'exposition. Enfin, l'internalisation des monomères et des différentes souches d'alpha-synucléine a également été analysée par microscopie à fluorescence. J'ai marqué les monomères et les assemblages d'alpha-synucléine par l'ATTO488. Les neurones et astrocytes primaires ont ensuite été exposés à l'alpha-synucléine pendant 2 heures. Après lavage des cellules, le noyau des cellules est marqué par le colorant Hoesch et les images de microscopies sont effectuées en présence de bleu de trypan. Le bleu de trypan permet de quencher la fluorescence de l'alpha-synucléine extra-cellulaire.

La stratégie générale de l'étude de l'internalisation et de la dégradation des souches par l'alpha-synucléine est décrite dans la figure 27.

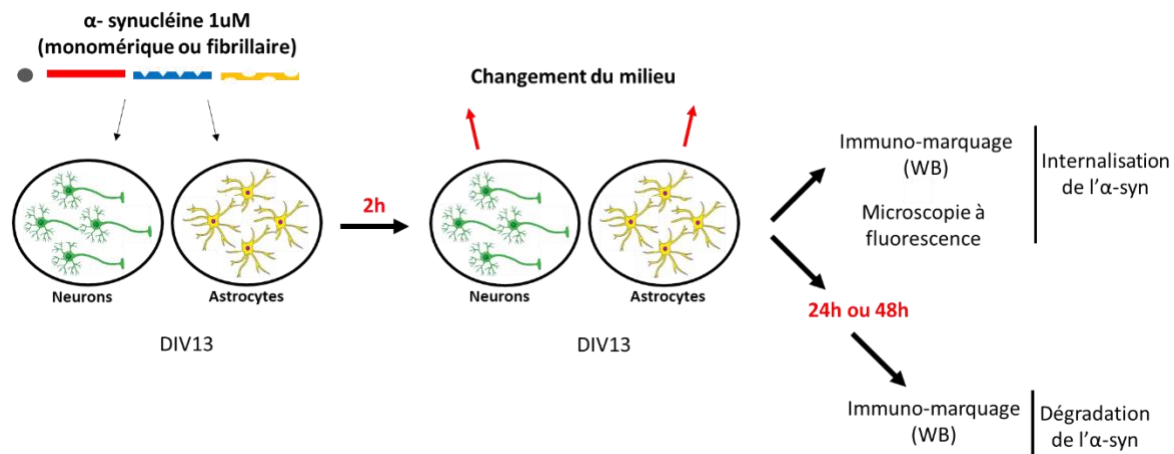


Figure 30: Etude de l'internalisation et de la dégradation de l'alpha-synucléine par les astrocytes ou les neurones

Les astrocytes et les neurones sont mis en culture pendant 13 jours puis exposés à de l'alpha-synucléine monomérique ou fibrillaire (fibres, rubans, fibres 91). Le milieu de culture est changé après 2 heure d'exposition. L'internalisation de l'alpha-synucléine par les cellules est alors analysé par immuno-marquage (western blot). Le reste des cellules est récupéré après 24 heures ou 48 heures et la dégradation de l'alpha-synucléine est analysée par immuno-marquage (western-blot).

Cette étude complémentaire in cellulo m'a permis de vérifier l'accessibilité des souches d'alpha-synucléine étudiées dans un contexte plus physiologique. Le second intérêt de cette étude est de vérifier si les différences de surfaces des souches entraînent des différences fonctionnelles, en termes de résistance à la dégradation et d'internalisation.

CHAPITRE 3: RESULTATS

Nous allons présenter dans cette partie l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse sous la forme de deux publications. La première concerne la cartographie de la surface accessible des fibres, des rubans et des fibres 91 d'alpha-synucléine. Elle vient d'être soumise à « Journal of Biological Chemistry ». La seconde traite de la dégradation de ces souches par des cultures primaires de neurones et d'astrocytes et sera soumise à PLOS One après correction.

1. Cartographie de la surface de souches d'alpha-synucléine

Cette première étude a pour but de déterminer les surfaces de trois souches d'alpha synucléine, les fibres, les rubans et les fibres 91, générées *in vitro*.

Nous avons, dans un premier temps, généré et caractérisé ces souches par microscopie électronique et protéolyse ménagée afin de vérifier que les assemblages présentent bien les propriétés précédemment décrites des fibres, rubans et fibres 91 (**Bousset et al., 2013, Makky et al., 2016, Shrivastava et al., 2020**). De manière intéressante, l'utilisation de différents anticorps monoclonaux ciblant les régions N-, C-terminal, ou la région centrale de l'alpha-synucléine permet de discriminer ces différentes souches ou les monomères d'alpha-synucléine confirmant ainsi l'existence de différences de surfaces entre ces agrégats.

Afin d'identifier ces surfaces, nous avons étudiés les fragments peptidiques générés par protéolyse ménagée dont les extrémités sont donc des régions accessibles aux protéases. Nous avons effectué des immunomarquages des peptides générés avec des anticorps monoclonaux anti-alpha synucléine et nous avons ainsi pu déterminer des régions de surface pour chacune des souches étudiées. La combinaison de ces résultats avec une étude par spectrométrie de masse MALDI-TOF des fragments peptidiques générés par protéolyse ménagée nous a permis d'identifier avec certitudes la majorité de ces peptides. Nous avons ainsi mis en évidence des sites accessibles pour chacune des souches. Certains de ces sites, en particulier sur la région C-terminale de la protéine, sont communs aux trois souches alors que les sites accessibles de la région N-terminale sont spécifiques de chacune des souches.

Dans le but de confirmer nos résultats et d'augmenter la résolution de cette cartographie, nous avons mis en place des expériences d'échange hydrogène-deutérium. Les résultats obtenus sont compatibles avec ceux des analyses des protéolyses ménagées. Cependant, les échanges hydrogènes-deutérium montrent une accessibilité un peu plus étendue des différentes souches,

en particulier au niveau de la région C-terminale. Les fibres, les rubans et les fibres 91 présentent donc une accessibilité importante de leurs régions C-terminales à partir de l'acide aminé 94. Les fibres sont également largement accessibles sur la région N-terminale, jusqu'à l'acide aminé 38, alors que les fibres 91 ne sont accessibles que jusqu'à l'acide aminé 17. Les rubans restent totalement inaccessibles sur la région N-terminale de l'alpha-synucléine.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude présentent un intérêt à la fois diagnostic et thérapeutique. En effet, les différences d'accessibilité de la région N-terminale des assemblages pourraient être utilisées afin de générer des molécules capables de discriminer des souches d'alpha-synucléine et ainsi obtenir un diagnostic fiable des synucléinopathies. De plus, l'accessibilité importante des trois souches sur la région C-terminale pourrait présenter un intérêt thérapeutique. La génération de molécules ciblant spécifiquement cette région pourrait permettre de "capturer" et de dégrader les agrégats d'alpha-synucléine, limitant ainsi leur propagation. D'un point de vue plus fondamental, la détermination des surfaces de ces souches peut également expliquer des différences de liaison aux protéines ou lipides environnants et ainsi permettre de comprendre les différences fonctionnelles observées en présence d'une souche ou d'une autre (Rey *et al.*, 2019, Shrivastava *et al.*, 2020).

Des études complémentaires, portant sur la détermination de la surface d'agrégats issus de patients atteints de synucléinopathies apparaissent maintenant indispensable afin de vérifier les informations de structure obtenues grâce à ce modèle *in vitro*. Les méthodologies optimisées et appliquées ici pourraient maintenant être mises en place pour l'analyse d'agrégats issus de patients. Cependant, le transfert de cette méthodologie *in vitro* vers l'analyse d'agrégats humains entraîne un certain nombre de complications. En effet, ces analyses nécessitent une quantité importante d'agrégats d'alpha-synucléine la plus pure possible. Or, la purification des agrégats humains est difficile à mettre en place en ne génère pas une quantité de protéine importante. La méthodologie d'amplification d'agrégats (PMCA, Protein Misfolding Cycling Amplification) est donc préférée au risque cependant de ne pas amplifier toutes les souches présentes dans un échantillon. En effet, il est possible que plusieurs souches d'alpha-synucléine co-existent chez un même patient, complexifiant encore l'analyse des résultats. Enfin, même si l'on détermine la surface accessible d'agrégats d'alpha-synucléine purifiés à partir du cerveau de patients, il est aussi probable que ces agrégats fixent d'autres protéines ou lipides et donc, que des régions de surface accessibles *in vitro* ne soient plus accessibles dans un contexte physiologique limitant ainsi les applications thérapeutiques potentielles. Cette étude n'est donc bien qu'un premier pas vers le développement d'outils diagnostics ou thérapeutiques concrets.

Mapping of three alpha-synuclein fibrillar polymorphs surfaces

Maud Landureau¹, Virginie Redeker¹, Stéphanie Eyquem², Ronald Melki¹

¹ Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Institut Francois Jacob (MIRCen), CNRS, CEA, University Paris-Saclay, 92260 Fontenay-Aux-Roses cedex, France.

² Sanofi R&D, Rare & Neurologic Diseases Research Therapeutic Area, Neurodegeneration Research, 1 Avenue Pierre Brossolette, Chilly Mazarin 91380, France.

*Corresponding author: Virginie Redeker

E-mail: virginie.redeker@cns.fr

Running title: Surface mapping of alpha-synuclein strains

KeyWords: alpha-synuclein, protein misfolding, strains, limited proteolysis, hydrogen-deuterium exchange, mass spectrometry, surface mapping, neurodegenerative disease.

Abstract

Synucleinopathies are neurodegenerative diseases characterized by the presence of intracellular deposits containing the protein alpha-synuclein (aSYN) within patients' brain. It has been shown that aSYN can form structurally distinct fibrillar assemblies, also termed polymorphs or strains. We previously showed that distinct polymorphs bind to and seed differentially the aggregation of endogenous aSYN in neuronal cells which suggests that distinct synucleinopathies may be due to aSYN polymorphs. Here we used limited proteolysis, hydrogen deuterium exchange and differential antibody accessibility to identify amino-acid stretches at the surfaces of three different aSYN polymorphs assembled *in vitro*, named fibrils, ribbons and fibrils 91. We show that aSYN C-terminal region spanning residues 94-140 exhibits similar high accessibility to the solvent in the three polymorphs. Our results demonstrate that the N-terminal regions of the three aSYN polymorphs are organized differently. The N-terminal amino acid residues spanning residues 1-38 are exposed to the solvent within the polymorph fibrils, while only residues 1-19 are exposed within fibrils 91 and none within ribbons. The polypeptides exposed on the surface of distinct aSYN fibrillar polymorphs are comparable to fingerprints. The differences in the surface accessibility we report contribute certainly to the differential binding of distinct aSYN polymorphs to neuron membranes we demonstrated. Our findings have diagnostic and therapeutic potential, in particular in the prion-like propagation of fibrillar aSYN, as they allow designing ligands that specifically bind and distinguish one fibrillar polymorph from another.

Introduction

Parkinson's disease (PD), multiple system atrophy (MSA) and dementia with Lewy bodies (DLB) are characterized by the presence of aSYN-rich deposits within the central and peripheral nervous system [1, 2]. They are termed synucleinopathies.

The protein aSYN is abundant in the brain, especially in neurons, where it is involved in the regulation of

synaptic vesicle release and trafficking [3, 4, 5]. aSYN N-terminal sixty amino acid residues form a domain that can adopt an alpha-helical structure upon binding lipid vesicles [6, 7]. The amino acid residues stretch 61 to 95 is hydrophobic and prone to form amyloid fibrils. It is named the Non Amyloid- β Component domain [8]. The C-terminal extremity, from the amino acid residue 96 to 140, is negatively charged. It binds metal ions and protein partners [9]. Monomeric alpha-synuclein is flexible and can adopt multiple conformations depending on its environment or partners [10].

In synucleinopathies, beta-strands rich aSYN conformations stack into fibrillar assemblies [11]. These assemblies are able to elongate by monomeric aSYN. This phenomenon is named seeding [8, 12-14]. These aggregates can trap other proteins or lipids and affect their physiological activities [15]. Furthermore, alpha-synuclein aggregates alter cellular homeostasis and proteostasis and compromise the integrity of organelles leading to neurodegeneration and chronic inflammation [16-18]. Numerous studies have shown that fibrils traffic between cells. The fibrils seed the aggregation of endogenous aSYN within naïve cells. This is believed to be at the origin of prion-like propagation within the brain [12].

Distinct synucleinopathies affect different brain regions and cell types. They progress at different rates and exhibit distinct symptoms [19, 20]. The existence of aSYN assemblies with distinct structures, named strains by analogy with different prion diseases [21], has been proposed to account for different synucleinopathies and evidences supporting this working hypothesis have been brought [22, 23]. Furthermore, an increasing number of reports suggest that aSYN aggregates in the brain of patients with MSA, DLB or PD are structurally distinct [24-26].

We previously established stringent experimental conditions under which aSYN assembles into pure structurally distinct fibrillar polymorphs we named fibrils, ribbons and fibrils 91 [22, 27, 28]. These strains have characteristic shapes in transmission electron microscopy (TEM), different physical properties as documented by atomic force microscopy [28], different

secondary structure contents and distributions as assessed by solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy (ssNMR) and different proteolytic profiles [22, 27, 29, 30]. We further established a structure-function relationship by showing that the structural differences between strains impact their ability to bind neuronal cells [31], seed the aggregation of endogenous aSYN, spread within the central nervous system and impact the motor behavior of affected animals [23, 32].

Recent developments in Cryo-electron microscopy allow determining to an atomic resolution the structure of the rigid core of fibrillar assemblies [33]. This method neither allows fully identifying the amino acid stretches exposed to the solvent at the surfaces of fibrillar assemblies nor how regions that are less rigid than the amyloid core are organized around it within those assemblies.

The polypeptide stretches exposed at the surfaces of fibrillar polymorphs define their protein and lipid interactomes. It is therefore of utmost importance to define them at the highest possible resolution to better understand what underlies their differential binding to neuronal cells, resistance to clearance and spread [31, 32].

Here we identify the amino acid stretches exposed to the solvent at the surface of aSYN fibrillar polymorphs fibrils, ribbons and fibrils 91. We used limited proteolysis [35] followed by western blotting with specific antibodies and mass spectrometry to determine regions from different fibrillar polymorphs exposed to the solvent. We next strengthened our results by determining solvent accessibility at the amino acid level by performing hydrogen-deuterium exchange coupled with mass spectrometry measurements [36].

We demonstrate that aSYN C-terminal amino acid stretch 94-140 is highly accessible to the solvent in all three fibrillar polymorphs. This contrasts with the polymorphs-dependent differential exposure of aSYN N-terminal domain. Indeed, while aSYN amino acid stretch 1-38 is exposed to the solvent in the polymorph fibrils, it is fully inaccessible in ribbons and accessible in part (residues 1-19) in the polymorph fibrils 91. The differences we observe reflect differences in polypeptide folding.

Our findings suggest that it is possible to design ligands with diagnostic and therapeutic potential, that target distinct aSYN accessible surfaces and are capable of distinguishing different aSYN strains.

Results

aSYN fibrillar polymorphs characterization

We used different experimental conditions to assemble human recombinant wild type aSYN into the three distinct fibrillar polymorphs, fibrils, ribbons and fibrils 91. The polymorph fibrils was obtained under physiological salt concentration [22], ribbons were formed in a buffer with a low salinity and fibrils 91 were generated in a buffer with a high pH, as previously described [22, 27, 28].

The homogeneity and nature of the fibrillar polymorphs was first assessed by transmission electron microscopy (Figure 1A). Fibrils and fibrils 91 had a cylindrical aspect while ribbons appeared flat [22, 28].

We next subjected the three fibrillar polymorphs to limited proteolysis using proteinase K and thermolysin to assess their characteristic fingerprints. Proteinase K and thermolysin can cleave theoretically 78 and 54 peptide bonds within aSYN, respectively. These two unspecific proteases will cleave a subset of those peptide bonds under the experimental conditions we designed, within amino acid stretches exposed to the solvent at the surface of the different polymorphs.

Highly reproducible, strain-specific and protease-specific proteolytic profiles were obtained after SDS-PAGE and staining with Coomassie blue (Figure 1B and C) under conditions where monomeric aSYN is fully degraded within 5 minutes (Figure S1). These results demonstrate unequivocally that structurally distinct fibrillar aSYN polymorphs expose to the solvent different polypeptide chains.

All resulting proteolytic reaction products appeared fibrillar upon assessment by TEM (Figure S2). Their bundling propensity increased. This is consistent with the loss of the C-terminal highly charged end. All the proteolytic polypeptides were found in the pellet when PK and thermolysin treated fibrils, ribbons and fibrils 91 were subjected to ultracentrifugation (Figure S2).

This demonstrates that aSYN polypeptides remain bound together within the fibrillar structures under our experimental conditions until denaturation. This further indicates that our proteolytic treatment only affects fibrils surfaces, not their amyloid core.

Differential accessibility of aSYN regions within fibrillar polymorphs to monoclonal antibodies

We first assessed the accessibility of polypeptide stretches spanning aSYN primary structure to different antibodies in aSYN monomers, fibrils, ribbons and fibrils 91. The different species were immobilized on nitrocellulose membranes that were exposed to monoclonal antibodies directed against aSYN amino acid stretch 1-15 (ASyM), 91-99 (Syn1) and 118-127 (10D2) (Figure 1D). ASyM bound all species except ribbons which indicates that its epitope is involved in ribbons amyloid core, in agreement with solid state NMR data we previously obtained [22, 27, 29, 30]. The antibody 10D2 bound to all fibrillar polymorphs, indicating that aSYN C-terminal end is exposed to the solvent, again in agreement with previous solid state NMR data [22, 27, 29, 30]. Interestingly, 10D2 binds better fibrillar aSYN polymorphs than its monomeric form, which either reflects a low affinity for aSYN C-terminal domain or a preferential binding to a conformation aSYN C-terminal domain adopts in fibrillar polymorphs. Syn 1, was found to bind best monomeric aSYN. This agrees with the partial or full involvement of aSYN amino acid stretch 91-99 within the amyloid core of the fibrillar polymorphs [22, 27, 29, 30].

Mapping of aSYN fibrillar polymorphs surfaces by limited proteolysis

We next identified the polypeptides generated by limited proteolytic cleavage of aSYN fibrillar polymorphs by proteinase K and thermolysin using two approaches.

We first performed western blotting after limited proteolysis using the monoclonal antibodies ASyM, 5G4, 10C3, Syn1 [38] and 10D2 directed against aSYN amino acid stretches 1-15, 46-53, 98-105, 91-99 and 118-127, respectively (Figures 2) . Syn1 recognized all the bands seen after SDS-PAGE and staining with

Coomassie blue. This indicates that the amino acid stretch 91-99 is present in all proteinase K and thermolysin cleavage products (Figures 1 and 2). The presence or absence of ASyM, 5G4, 10C3 and 10D2 epitopes within the different proteolytic polypeptides was next assessed after membranes stripping and probing with the different antibodies.

The antibody ASyM bound to all polypeptides derived from proteinase K treatment of the polymorph ribbons but not the polymorphs fibrils and fibrils 91 as confirmed by the merge of Syn1 and ASyM immunodetection (Figure 2 A, B, C). We conclude from this observation that the amino-acid stretch 1-15 is inaccessible to proteinase K in the polymorph ribbons while it is in the polymorphs fibrils and fibrils 91. The antibodies 5G4 and 10C3 bound all polypeptides identified by SDS-PAGE and by Syn1 after proteinase K treatment (Figure 2 A, B, C). We conclude from this observation that the amino-acid stretch 47-105 is inaccessible to proteinase K in all aSYN fibrillar polymorphs. Most proteolytic polypeptides lacked 10D2 antibody binding (Figure 2 A, B, C) which indicates the amino-acid stretch 118-127 is accessible to the protease and the polypeptides are C-terminally truncated.

The binding of ASyM, 5G4, 10C3 and 10D2 to aSYN fibrillar polymorphs fibrils, fibrils 91 and ribbons thermolysin cleavage products (Figure 2 C, D, E) is in full agreement with the results obtained with proteinase K. It shows that the amino-acid stretch 1-15 is inaccessible to thermolysin in aSYN polymorph ribbons while it is in the polymorphs fibrils and fibrils 91, that the amino-acid stretch 46-105 is inaccessible to thermolysin in all aSYN fibrillar polymorphs and that the amino-acid stretch 118-127 is accessible to the protease in all aSYN fibrillar polymorphs.

Second, we identified all aSYN fibrillar polymorphs proteinase K and thermolysin cleavage products by mass spectrometry (MS). We used matrix assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) type in the linear mode, with a synapinic acid matrix given the apparent molecular weight of the polypeptides (>8000 Da). The MS spectra of the polypeptides generated after 15 min cleavage by proteinase K and thermolysin are displayed in Figure 3. Their identity, established in accordance to aSYN N- and C-terminal domains accessibility we observed by immunodetection and

their mass accuracy are listed in Tables S1 and S2, respectively.

These data clearly demonstrate that the C-terminal polypeptide stretch 111-140 is highly accessible to proteolysis in all fibrillar aSYN strains (Figure 3). Our data also show that the aSYN N-terminal polypeptide stretch 1-19, where multiple cleavages occur (Figure 3) is inaccessible in the polymorphs ribbons while it is in fibrils and fibrils 91, and the polypeptide 1-31 is accessible only in the polymorph fibrils. Small polypeptides (<4000 Da) resulting from limited proteolysis of fibrillar aSYN polymorphs by proteinase K and thermolysin were identified by MALDI-MS using HCCA as matrix and in reflectron mode. Proteinase K and thermolysin treatment yielded abundant C-terminal peptides complementary to the large polypeptides: the 126-140 peptide (at MH^+ 1773,75 Da and MNa^+ at 1795,73 Da) and 112-140 peptide (at MH^+ 3375,36 Da, MNa^+ 3397,49 Da) after proteinase K and thermolysin treatment respectively. No abundant N-terminal polypeptides were detected, either because additional cleavages occurred and produced N-terminal peptides too small to be detected in the analyzed mass range, or because the N-terminal polypeptides, when produced, are further degraded.

The differential exposure to the solvent of aSYN polypeptide chain within the fibrillar polymorphs fibrils, ribbons and fibrils 91 derived from the proteolytic cleavage assessment we performed is summarized in Figure 4. Altogether, our data indicate that aSYN C-terminal end is exposed in a similar manner to the solvent and therefore accessible to proteases in three structurally distinct fibrillar polymorphs. This contrasts with the N-terminal end which appears exposed to different extents in the polymorphs fibrils and fibrils 91 but not in ribbons.

Mapping of aSYN fibrillar surfaces by hydrogen-deuterium exchange

To further strengthen our results, we performed hydrogen deuterium exchange experiments coupled to MALDI-MS measurements (HDX-MS). Indeed, the backbone amide hydrogen atoms of proteins exchange continuously with the hydrogen atoms from the solvent. Furthermore, the amino acid stretches at the

surface of a protein exchange faster than those buried within its core [36].

We first optimized the HDX-MS strategy so that rapid and efficient digestion of different aSYN fibrillar polymorphs yields peptides with similar masses. We obtained, based on exact mass measurements by MALDI-MS of peptides generated following treatment of the different fibrillar polymorphs by pepsin (Enzyme-to-Protein ratio of 100:1) after HDX, a sequence coverage of 98% and 97% for aSYN monomers and fibrillar polymorphs respectively (Table S3). The identity of the pepsin-derived peptides, both protonated and with sodium adducts, was confirmed by CID fragmentation of non-deuterated samples using both nanoLC-MSMS and MALDI-TOF-TOF (Figure S3). The peptide ions used for HDX measurements were peptides with a sodium adduct as they are much better detected and more abundant as non mono-protonated peptides. We confirmed that the HDX with or without sodium adduct were similar for several abundant peptides.

HDX kinetics were derived from aSYN monomers and fibrillar polymorphs incubation for 2, 30 and 120 minutes in a deuterium (D_2O) buffer. Monomeric aSYN pepsin-derived peptides exhibited 70 to 100% HDX levels after 2 minutes incubation in D_2O (Table S4). HDX measurements were performed on partially assembled aSYN fibrillar polymorphs so that pepsin-derived peptides originating from aSYN monomers can be used as internal controls within any given HDX mass spectrum (Figure S4). All peptide protected from the solvent within an aSYN fibrillar polymorph will yield bimodal spectral distributions of isotopic envelopes under our experimental conditions. The first isotopic envelope represents the peptide protected within the fibrillar polymorph while the second isotopic envelope originates from the corresponding peptide from monomeric aSYN, as previously observed [39]. In contrast, peptides exposed at the surfaces of aSYN fibrillar polymorphs exhibit unimodal spectral distributions of isotopic envelopes given they exchange equally well in aSYN monomers and fibrillar polymorphs. The maximal deuterium incorporation was reached within 30 min for most of the pepsin-derived peptides we analyzed. The different pepsin-derived peptides from aSYN fibrillar polymorphs exhibited HDX levels ranging from 1 to 100% after 30 minutes incubation in D_2O (Figure 5, Table S3).

Several polypeptides that almost do not exchange hydrogens for deuteriums, even within 120 minutes, were identified for all three aSYN fibrillar polymorphs. The peptide 39-54, for example (Figure S4 A, dark grey box), exhibits an isotopic distribution close to that of the peptide incubated in H₂O. We measured the incorporation of a single deuterium within this peptide after 30 minutes incubation of fibrils in deuterium. Considering the total number of exchangeable hydrogens (15) and the average back exchange (43%), the level of deuterium exchange is 11%. In contrast, peptide 95-113 appears as exposed to the solvent in monomeric and fibrillar aSYN polymorphs (Figure S4 B, light grey box).

Overall, the HDX measurements we performed demonstrate that aSYN amino acid stretch 95-140 is highly exposed to the solvent within all fibrillar polymorphs. This contrasts with aSYN N-terminal end that appears exposed till residues 38 or 17 in the polymorphs fibrils and fibrils 91, respectively but not at all in the polymorph ribbons. (Figure 5, Table S3). These findings are in full agreement with the differential antibodies accessibility and limited proteolysis data.

Discussion

The structures, at an atomic resolution, of the core of several aSYN fibrillar polymorphs assembled in vitro or purified from the brain of patients and subjected to proteolytic treatments have been reported recently [25, 26, 33, 40-45]. The density maps of the core of aSYN fibrillar polymorphs obtained by cryo-EM provide incomplete information on the amino acid stretches exposed to the solvent at the surface of the fibrillar polymorphs, in particular when those amino acid stretches are flexible. Identifying to the highest extent those surfaces is critical as it is through those surfaces that aSYN fibrillar polymorphs interact with their cellular partners, leading eventually to their pathogenic redistribution. Using a combination of state-of-the-art methods that can yield information at an atomic resolution, namely differential accessibility of monoclonal antibodies, limited proteolysis and HDX measurements we have mapped the surfaces of distinct aSYN fibrillar polymorphs.

aSYN Fibrillar polymorphs surfaces

We show here that aSYN C-terminal amino acid stretch spanning 94-140 within all three aSYN polymorphs we analyzed is highly exposed to the solvent. This is consistent with the solid state NMR data we generated indicating that aSYN C-terminal end is flexible within those fibrillar polymorphs [27, 29, 30]. Our results are also consistent with the two polymorphic structures of aSYN fibrils solved by cryo-EM showing that the amino acid residues stretch 95-140 is dynamic and thus unresolved [33]. The regions identified by HDX as exposed to the solvent within aSYN fibrils is larger than that delineated by limited proteolysis. This is due to the fact that proteases binding to protein substrates requires larger accessible polypeptide stretches.

Our limited proteolysis show that PK and thermolysin cleave all fibrillar polymorphs at residues 113 or 125 and 111, respectively. Interestingly, the C-terminal complementary fragments (peptides 125-140 for proteinase K and 112-140 for thermolysin) were not progressively degraded into shorter polypeptides. This suggests that the proteases distinguish a subset of cleavage sites within aSYN C-terminal domain (residues 95-140) in the fibrils under our experimental conditions with as a consequence cleavage at defined sites but not at others. This in turn suggests that aSYN amino acid stretch 112-140 exhibits a stable secondary structure incompatible with further degradation. aSYN C-terminal end has been proposed to play a role in protofilament-protofilament interaction within the fibrillar form of the protein [37, 46].

aSYN fibrillar polymorphs remained of fibrillar nature as assessed by TEM imaging after 15 minutes proteolysis. This suggests that the intra and inter-molecular interactions within the fibrillar polymorphs hold the resulting proteolytic products together. Fibrillar aSYN polymorphs had a tendency to bundle after proteolysis, in a manner similar to fibrils assembled from C-terminally truncated aSYN [47, 48]. This is certainly due to the loss of the negatively charged C-terminal moiety that repel the fibrils from one another.

We observed striking differences in aSYN N-terminal end exposure to the solvent in distinct fibrillar polymorphs. While aSYN N-terminal end was fully inaccessible to proteinase K and thermolysin, also highly protected in HDX measurements in ribbons it

was found exposed to the solvent till amino acid residues 38 or 17 in the polymorphs fibrils and fibrils 91, respectively. These findings are consistent with those we reported previously using solid-state-NMR measurements [27, 29, 30] and illustrate the power of the approach we implemented to map structural polymorphism within amyloid fibrils. All the amino acid stretches we identify as exposed to the solvent are within regions we previously showed not to adopt a beta strand conformation except two, spanning residues 16-20 and 35-38 in aSYN polymorph fibrils that appear exposed to the solvent based both on limited proteolysis and HDX. Interestingly, albeit in beta strand conformations, these amino acid stretches appear at the surface of the fibrils based on the CryoEM structures we solved [33].

Impact of our findings on understanding distinct synucleinopathies and developing therapeutic and diagnostic tools

Mapping of the surfaces of pathologic aSYN fibrillar polymorphs to the highest possible resolution enables understanding how they interact with cellular components and through proteomic studies and in silico modeling the identification of their local interactomes. We report here structural differences and similarities between distinct fibrillar aSYN polymorphs. The finding that aSYN polypeptide stretch spanning residues 95-140 is accessible to antibodies, to proteases and exposed to the solvent in all fibrillar polymorphs suggests that this region does not allow distinguishing a fibrillar polymorph from another. It also suggests that the cellular interactome of this region is common in structurally distinct aSYN fibrillar polymorphs. This finding is in sharp contrast with what we report for aSYN N-terminal end. Indeed, the accessibility to antibodies, to proteases and exposure to the solvent of the polypeptide stretch spanning residues 1 to 38 allows discriminating distinct aSYN fibrillar polymorphs. The differential exposure of aSYN N-terminal polypeptide stretch to the solvent within fibrillar assemblies suggests they have different interactomes and as a consequence distinct pathogenic functional properties and tropism for neuronal cells.

Altogether our results show that ligands of the C-terminal end of aSYN possess diagnostic potential for all synucleinopathies while ligands of aSYN N-

terminal end, allow distinguishing one synucleinopathy from another. In all cases, such ligands may hold therapeutic potential as they interfere and may prevent the interaction between pathogenic assemblies and yet to be fully identified partners.

Further characterization of pathogenic aSYN assemblies derived from patients' brains using the strategy we implemented and identification of the generic and specific interactomes will lead to a better understanding of synucleinopathies and the design of ways to interfere with their prion-like propagation.

Methods

Production and assembly of recombinant aSYN

Recombinant aSYN production and assembly into the fibrillar polymorphs fibrils, ribbons and fibrils 91 was performed as previously described [52, 22, 28, 31]. Assembly was monitored using Thioflavin T as previously described [22]. Monomeric alpha-synuclein concentration was determined spectrophotometrically using the extinction coefficients $5960 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 280 nm. Samples used for limited proteolysis and antibodies accessibility were spun at 100 000 g for 30 minutes after assembly. Fibrillar assemblies concentration was determined by subtracting the concentration of aSYN in the supernatant fraction from the initial protein concentration. The nature of aSYN fibrillar polymorphs was assessed using TEM as previously described [22].

Limited proteolysis

Monomeric or fibrillar aSYN (1,4 mg/ml equivalent monomer concentration) were digested at 37°C in PBS with Proteinase K (3,8 ug/ml) (Roche) or in 50mM Tris pH8, 0,5mM CaCl_2 with thermolysin (5ug/ml) (Sigma). Aliquots were removed at different time intervals following addition of the protease (0, 1, 5, 15, 30 and 60 minutes) and transferred into Eppendorf tubes with proteinase K or thermolysin inhibitors (respectively PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride, or EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid). Samples were dried using speed vacuum and further solubilized by addition of pure HFIP (Hexafluoroisopropanol). After evaporation of HFIP, the samples were resuspended in Laemmli buffer, heated 10 minutes at 70°C and processed for Tris-Glycine SDS-PAGE (12%) analysis.

Western-blot analysis

Samples subjected to Proteinase K or thermolysin treatment for 15 minutes and solubilized and subjected to SDS-PAGE analysis were transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% skimmed milk for 1h, then incubated overnight with the antibodies ASyM (clone number 4.2, Agrisera, AS13 2719), 5G4, 10C3 or 10D2 (Analytic Jena, ref 847-0102004001, 847-010200180 and 847-0102004701 respectively). The membranes were washed with TBST (20mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated for 1 hour with a goat anti-mouse IgG (GeneTex GTX 213111-01) couples to HRP and imaged using a chemidoc imager (biorad). The membranes were stripped using 62.5mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 100mM beta-ME (beta-mercaptoethanol) for 1 hours at 50°C prior to immunostaining a second time with the antibody syn1 (Biosciences, Ref 610787).

Assessment of antibodies accessibility

Native monomeric or fibrillar aSYN polymorphs (2.5µM, 2uL) were spotted in quadruplicate on a nitrocellulose membrane. The membrane was next blocked with 5% skimmed milk for 1 hour and incubated with different antibodies as described above. Statistical analyses were performed using the software Prism GraphPad. Because of the number of replicates (n=3), we used Kruskal-Wallis test with a significance with a p value < 0.05.

Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) measurements

aSYN Monomers and fibrillar polymorphs (100uM) were subjected to proteinase K or thermolysin treatment for 15 minutes. The reactions products were solubilized in HFIP as described above and 1:10 (for the analyses of long polypeptides, ranging from 4 000 to 15 000 Da) or 1:20 (for the analyses of short polypeptides, ranging from 800 to 4 000 Da) in trifluoroacetic acid (TFA 0.1%). Samples were subjected to MALDI-MS analysis, using Sinapinic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, Aldrich) or HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, Aldrich) as matrices for long and short peptides, respectively. Both matrices were prepared as saturated solutions in 50% acetonitrile (ACN) and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The spectra were acquired on a MALDI-TOF/TOF 5800 (AB Sciex). Mass measurements were performed in linear or reflectron modes for long and short polypeptides, respectively. External mass calibration was achieved using full length aSYN or Pepmix4, a mixture of bradykinin 1-5 (573.3149 Da) ,

angiotensin (1046.2 Da), Neurotensin (1672.9175 Da), ACTH [18-39] (2465.1989 Da) and bovine insulin chain B (3495.9 Da) from LaserBio Labs (Sophia-Antipolis, France.), in linear and reflectron mode, respectively. For long polypeptides, full length aSYN present in the samples was further used for additional internal calibration. Identification of the peptide was performed using the GPMW 8.2 software and a minimum mass difference between measured and theoretical masses set at 100 ppm in reflectron mode and 300 ppm in linear mode. Three independent replicates were performed for each type of analysis.

Hydrogen/deuterium exchange experiments

The protocol we used was adapted from Redeker et al [51]. aSYN monomers and fibrillar polymorphs were treated in parallel. Hydrogen to deuterium exchange was initiated by diluting (1:20, e.g. 2µl of the protein sample (1.4mg/ml) into 38 µl of 99,9% pure solution of D₂O, (Aldrich)). To achieve an exchange kinetic in reproducible conditions, samples were then incubated at 20 °C for 2, 30 or 120 minutes. The exchange reaction was quenched by decreasing the temperature and the pH rapidly (0°C, pH 2,5) by addition of 120uL of an ice-cold solution of formic acid (3%) in water. The quenched samples (160uL) were immediately further digested at 0°C using molten ice by addition of 120µl of immobilized pepsin (Thermo Scientific) at an enzyme to protein ratio 100 : 1 w/w). The digestion reactions were carried out for 2 minutes in the upper tail of an ultrafree-MC tube (Merck-Millipore, UFC30GV0S) and the reaction products were recovered in the tube by a short spin at 10 000g (30sec, 0°C).

The pepsin-derived peptides (6uL) were loaded onto a C18 Zip-Tip, desalted as previously described [51], spotted onto the MALDI plate under a nitrogen flow and directly analyzed on a MALDI-TOF/TOF 5800 (AB Sciex). The spectra were acquired in the positive and reflectron ion mode in the m/z range 800–5000. An external mass calibration was applied using Pepmix4. Further internal calibration was performed using peptide 95-113+ Na (2075.07), well characterized by MALDI MS/MS fragmentation (CID) as shown in Figure S3. Mass difference between measured and theoretical masses was set at 50 ppm.

All spectra were analyzed using peak view software. As the peaks of peptides with sodium adduct have a better intensity, we first confirmed their identity by further desalting directly on the MALDI plate and by CID fragmentation) using MALDI-TOF-TOF (Figure S4). We completed this identification by nanoLC-

MSMS with a 3TOF mass spectrometer. Peptides were identified based on their Mascot score and after a manual validation using Peak View.

We then analyzed HDX of those peptide peaks. The amount of hydrogen to deuterium exchange was calculated as previously described [43] except that the baseline correction was done directly on peak view software, using the height centroid spectrum option. The centroid mass value of the isotope distribution was calculated as :

$$\sum(\text{weighted areas} * \text{isotopic mass})$$

where the weighted area is the area of one isotope divided by the sum of the areas of all the isotopes

composing the isotopic peak envelope and the isotopic mass is the mass of the considered isotope.

All the experiments were done in triplicate. The data we present are those obtained after 30 minutes exchange in D₂O when maximum deuterium incorporation is observed. The mean standard deviation is 4% and the maximum standard deviation measured is <12%. To calculate the back exchange, we digested alpha-synuclein monomers during 2 minutes by pepsin and we incubated the samples in D₂O during 24 hours. We then analyzed HDX and compared the theoretical mass of fully deuterated peptides with the experimental mass obtained on 6 peptides. We calculated a back exchange of 43%.

Acknowledgments

We thank Tracy Bellande for expert technical assistance and the Proteomic-Gif SICaPS platform (I2BC), supported by IBiSA, Ile de France Region, Plan Cancer, CNRS and Paris-Sud University, for allowing us to use their MS equipment and in particular Laïla Sago and David Cornu for their assistance .

Funding sources and disclosure of conflicts of interest

This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Medicale (contract DEQ. 20160334896 and ALZ201912009776) and the EU Joint Programme on Neurodegenerative Disease Research and Agence National de la Recherche (contracts PROTEST-70, ANR-17-JPCD-0005-01 and Trans-PathND, ANR-17-JPCD-0002-02). This work has also received support from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme and EFPIA Innovative Medicines Initiative 2 grant agreements No 116060 (IMPRiND) and No. 821522 (PD-MitoQUANT), the Swiss State Secretariat for Education, Research and Innovation (SERI) under contract number 17.00038, Parkinson UK and SANOFI.

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. (1998) *alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 6469–6473.
2. Goedert, M. (2001) *Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases*. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 492–501.
3. Jakes R., Spillantini M.G., Goedert M.(1994) *Identification of two synucleins from human brain*, *FEBS letters* 345, 27-32.
4. Burré J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M.R., Südhof T.C. (2010) *alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro*, *Science*, 329(5999):1663-1667.
5. Burré J. (2015) *The synaptic function of alpha-synuclein*, *Journal of Parkinson's Disease*, vol.5, no. 4, pp. 699-713.
6. Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., George J.M. (1998) *Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes*, 17;(273(16):9443-9.
7. Eliezer D., Kutluay E., Bussell R. Jr, Browne G. (2001) *Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states*, *J Mol Biol.*, 6;307(4):1061-73.
8. Rodriguez J.A., Ivanova M.I., Sawaya M.R., Cascio D., Reyes F., Shi D., Sangwan S., Guenther E.L., Johnson L.M., Zhang M., Jiang L., Arbing M.A., Nannegga B., Hattne J., Whitelegge J., Brewster A.S., Messerschmidt M., Boutet S., Sauter N.K., Gonen T., and Eisenberg D. (2015) *Structure of the toxic core of alpha-synuclein from invisible crystals*, *Nature*, 24;525(7570):486-490.
9. Binolfi A., Rasia R.M., Bertoncini C.W., Ceolin M., Zweckstetter M., Griesinger C., Jovin T.M., Fernandez C.O. (2006) *Interaction of alpha-synuclein with divalent metal ions reveals key differences: a link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement*, *American Chemical Society*, 128, 30, 9893-9901.
10. Alam P., Bousset L., Melki R., Otzen D.E. (2019) *alpha-synuclein and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities*, *J Neurochem*, 150(5):522-534.
11. Jucker M., Walker L.C. (2013), *Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases*, *Nature*, 5;501(7465):45-51.
12. Brundin P., Melki R., Kopito R. (2010) *Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases*, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4):301-307.
13. Melki R. (2018) *How the shapes of seeds can influence pathology*, *Neurobiology of disease*, 109:201-208.
14. Oosawa F., Asakura S. (1975) *Thermodynamics of the polymerization of protein*, Academic Press Inc.
15. Shrivastava A.N., Aperia A., Melki R., Triller A. (2017) *Physico-pathologic mechanisms involved in neurodegeneration: misfolded protein-plasma membrane interactions*, *Neuron.*, 5;95(1):33-50.
16. De Mattos E/P/, Wentink A., Nussbaum-Krammer C., Hansen C., Bergink S., Melki R., Kampinga H.H. (2020) *Protein quality control pathways at the crossroad of synucleinopathies*, *J Parkinson Dis.*, 24.

17. 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.*, 134(4):629-653.
18. Gustot A., Gallea J.I., Sarroukh R., Celej M.S., Ruysschaert J.M., Raussens V. (2015) Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in Parkinson's disease, 1;471(3):323-33.
19. Yamasaki T.R., Holmes B.B., Furman J.L., Dhavale D.D., Su B.W., Song E.S., Cairns N.J., Kotzbauer P.T., Diamond M.I. (2019) Parkinson's disease and multiple system atrophy have distinct α -synuclein seed characteristics, *J Biol Chem*, 18;294(3):1045-1058.
20. McCann H., Stevens C.H., Cartwright H., Halliday G.M., (2014) α -Synucleinopathy phenotypes, *Parkinsonism and related disorders*, 20S1 S62-S67.
21. Chien P., Weissman J.S., DePace A.H. (2004) Emerging principles of conformation-based prion inheritance, *Annu. Rev. Biochem*, 73:617-56.
22. Bousset L., Pieri L., Ruiz-Arlandis G., Gath J., Henning Jensen P., Habenstein B., Madiona K., Olieric V., Böckmann A., Meier B. H., Melki R. (2013) Structural and functional characterization of two α -synuclein strains, *Nature communications*, 4:2575.
23. Peelaerts W., Bousset L. Van der Perren a., Moskalyuk A., Pulizzi M., Van den Haute C., Melki R., Baekelandt V. (2015) α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration, *Nature*, V522, 340:344.
24. Shahnawaz M., Mukherjee A., Pritzkow S., Mendez N., Rabadia P., Liu X., Scmeichel A., Singer W., Wu G., Tsai A.L., Shirani H., Nilsson P.R., Low P.A., Soto C. (2020) Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy, *Nature*, 578(7794): 273-277.
25. Strohäker T., Jung B.C., Liou S.H., Fernandez C.O., Riedel D., Becker S., Halliday G.M., Bennati M., Kim W.S., Lee S.J., Zwecksteter M. (2019) Structural heterogeneity of α -synuclein fibrils amplified from patient brain extracts, *Nat. com.*, 10:535.
26. Van der Perren A., Gelders G., Fenyi A., Bousset L., Brito F., Peelaerts W., Van den Haute C., Gentleman S., Melki R., Baekelandt V. (2020) The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies, *Acta Neuropathol.*
27. Verasdonck J., Bousset L., Gath L., Melki R., Böckmann A., Meier BH. (2016) Further exploration of the conformational space of α -synuclein fibrils: solid-state NMR assignment of a high-pH polymorph, *Biomol NMR Assign.*, 10(1) :5-12.
28. Makky A., Bousset L., Polesel-Maris J., Melki R. (2016) Nanomechanical properties of distinct fibrillar polymorphs of the protein α -synuclein, *Scientific reports*, 6:37970.
29. Gath J., Habenstein B., Bousset L., Melki R., Meier BH., Böckmann A. (2012) Solid-state NMR sequential assignments of α -synuclein, *Biomolecular NMR Assignments*, 6(1) :51-55.
30. Gath J., Bousset L., Habenstein B., Melki R., Böckmann A., Meier BH. (2014) Unlike twins: an NMR comparison of two α -synuclein polymorphs featuring different toxicity, *PLoS One*, 5; 9(3):e90659.
31. Shrivastava A. N., Bousset L., Renner M., Redeker V., Savistchenko J., Triller A., Melki R. (2020) Differential membrane binding and seeding of distinct α -synuclein fibrillar polymorphs, *Biophys J.*, 118, 1-20.
32. Rey N. L., Bousset L., George S., Madan Z., Meyerdirk L., Schulz E., Steiner J. A., Melki R., Brundin P. (2019), α -Synuclein conformational strains spread, seed and target neuronal cells differentially after injection into the olfactory bulb., *Acta Neuropathol Commun.*, 30;7(1):221.

33. Guerrero-Ferreira R., Taylor N.M., Arteni A.A., Kumari P., Mona D., Ringler P., Britschgi M., Lauer M.E., Makky A., Verasdonck J., Riek R., Melki R., Meier B. H., Böckmann A., Bousset L., Stahlberg H. (2019) Two new polymorphic structures of human full-length alpha-synuclein fibrils solved by cryo-electron microscopy, *Elife*, e48907.
35. Fontana A., Polverino de Laureto P., Spolaore B., Frare E., Picotti P., Zamboni M. (2004) Probing protein structure by limited proteolysis, *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 51 N°2, 299-321.
36. Zhang Z. and Smith D.L. (1993) Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation, *Protein Sci.*, 2(4): 522-531.
37. Qin Z., Hu D., Han S., Hong D-P., Fink A.L. (2007) Role of different regions of α -synuclein in the assembly of fibrils, *Biochemistry*, 46, 13322-13330.
38. Perrin R.J., Payton J.E., Barnett D.H., Wraight C.L., Woods W.S., Ye L., George J.M. (2003), Epitope mapping and specificity of the anti-alpha-synuclein monoclonal antibody Syn-1 in mouse brain and cultured cell lines, *Neurosci. Lett.*, 2;349(2):133-5.
39. Illes-Toth E., Rempel D.L., Gross M. L. (2018) Pulsed Hydrogen–Deuterium Exchange Illuminates the Aggregation Kinetics of α -Synuclein, the Causative Agent for Parkinson's Disease, *ACS Chem. Neurosci.*, 9, 1469–1476
40. Guerrero-Ferreira R., Taylor N.M., Mona D., Ringler P., Lauer M.E., Britschgi M., Stahlberg H. (2018) Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils, *Elife*, 7:e36402.
41. Li Y., Zhao C., Luo F., Liu Z., Gui X., Luo Z., Zhang X., Li D., Liu C., Li X., Amyloid fibril structure of α -synuclein determined by cry-electron microscopy, (2018), *Cell Res.*, 28(9):897-903.
42. Li B., Ge P., Murray K.A., Sheth P., Zhang M., Nair G., Sawaya M.R., Shin W.S., Broyer D.R., Ye S., Eisenberg D.S., Zhou Z.H., Jiang L., Cryo-EM full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel, (2018), *Nat. Commun.*, 6;9(1):3609.
43. Sun Y., Hou S., Zhao K., Long H., Liu Z., Gao J., Zhang Y., Su X.D., Li D., Liu C. (2020) Cryo-EM structure of full-length alpha-synuclein amyloid fibril with Parkinson's disease familial A53T mutation, *Cell Res.* 30(4):360-362.
44. Zhao K., Li Y., Liu Z., Long H., Zhao C., Luo F., Sun Y., Tao Y., Su X.D., Li D., Li X., Liu C. (2020) Parkinson's disease associated mutation E46K of alpha-synuclein triggers the formation of a distinct fibril structure, *Nat Commun.* 26;11(1):2643.
45. Zhao K., Lim Y.J., Liu Z., Long H., Sun Y., Hu J.J., Zhao C., Tao Y., Zhang X., Li D., Li Y.M., Liu C. (2020) Parkinson's disease-related phosphorylation at Tyr39 rearranges alpha-synuclein amyloid fibril structure revealed by cryo-EM, *Proc Natl Acad Sci USA*, 18;117(33):20305-20315.
46. Hong D-P., Xiong W., Chang J-Y., Jiang C. (2011) The role of the C-terminus of human α -synuclein : intra disulfide bonds between the C-terminus and other regions stabilize non-fibrillar monomeric isomers, *FEBS Letters*, Vol. 585, I.3, 561-566.
47. Ma L., Yang C., Zhang X., Li Y., Wang S., Zheng L., Huang K. (2018) C-terminal truncation exacerbates the aggregation and cytotoxicity of α -synuclein : A vicious cycle in Parkinson's disease, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*, 1864(12 :3714-3725.
48. Van der Wateren I.M., Knowles T.P.J., Buell A.K., Dobson C.M., Galvagnion C. (2018) C-terminal truncation of α -synuclein promotes amyloid fibril amplification at physiological pH, *Chem Sci.*, 24 ;9(25) :5506-5516.
49. Gallardo J., Escalona-Noguero C., Sot B., (2020) Role of α -synuclein regions in nucleation and elongation of amyloid fibre assembly, *ACS Chem Neurosci.*, 18;11(6):872-879.
50. Fenyi A., Leclair-Visonneau L., Clairembault T., Coron E., Neunlist M., Melki R., Derkinderen P., Bousset L. (2019) Detection of alpha-synuclein aggregates in gastrointestinal biopsies by protein misfolding cyclic amplification, *Neurobiol Dis.*, 129 :38-
51. Redeker V., Halgand F., Le Caer J-P., Bousset L., Lapr v te O., Melki R. (2007) Hydrogen/Deuterium exchange mass spectrometric analysis of conformational changes

accompanying the assembly of the yeast prion Ure2p into protein fibrils, *J. Mol. Biol.*, 369, 1113-1125.

52. 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

Abbreviations

CID: Collision-Induced Dissociation

Cryo-EM: Cryo-Electron Microscopy

D2O: Deuterium

DLB: Dementia with Lewy Bodies

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

HCCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

HDX-MS: Hydrogen-Deuterium exchange Mass Spectrometry

HFIP: HexaFluoroIsoPropanol

MALDI-TOF: MAtrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-Of-Flight

MSA: Multiple System Atrophy

NAC: Non Amyloid- β Component

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

PD: Parkinson's Disease

PMSF: Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TFA: Trifluoroacetic acid

TEM: Transmission Electron Microscopy

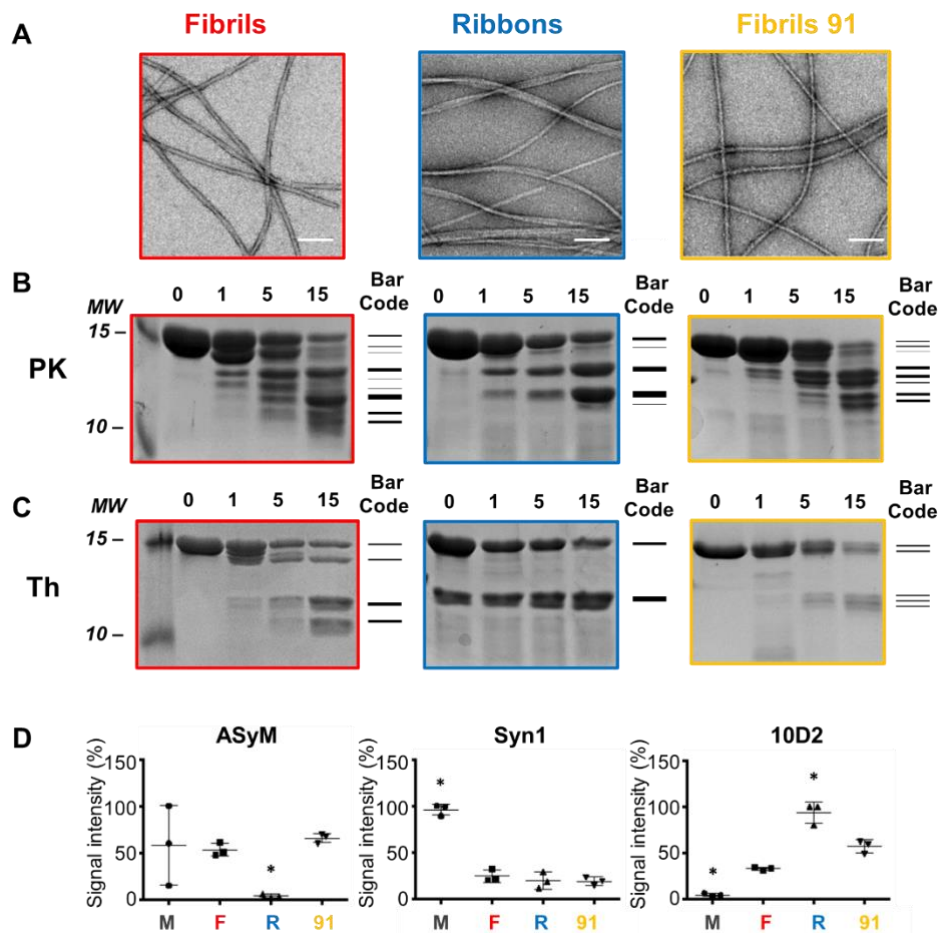


Figure 1: Characterization of alpha-synuclein fibrillar polymorphs. (A) Transmission electron micrographs of aSYN fibrillar polymorphs fibrils (red frame), ribbons (blue frame) and fibrils 91 (yellow frame), scale bar: 100nm. (B) Proteinase K (PK, 3.8 ug/ml) and (C) Thermolysin (Th, 5ug/ml) degradation patterns of aSYN fibrillar polymorphs fibrils, ribbons and fibrils 91 (100μM monomer concentration) monitored over time on Coomassie stained SDS-PAGE (15%). Time (min) and molecular weight markers (kDa) are shown on the top and left sides of the gels, respectively. The specific proteolytic profile of each aSYN strain, at time 15 minutes, is schematized as a bar code on the right side of each panel. (D) Comparative assessment of the binding of the antibodies ASyM, Syn1 and 10D2, directed against amino acid stretches 1-15, 91-99 and 118-127, respectively, to aSYN monomers, fibrils, ribbons and fibrils 91 by dot-blot analysis performed in triplicate. The error bars represent standard deviation. Statistical significance was verified by Kruskal Wallis test (*p<0.05).

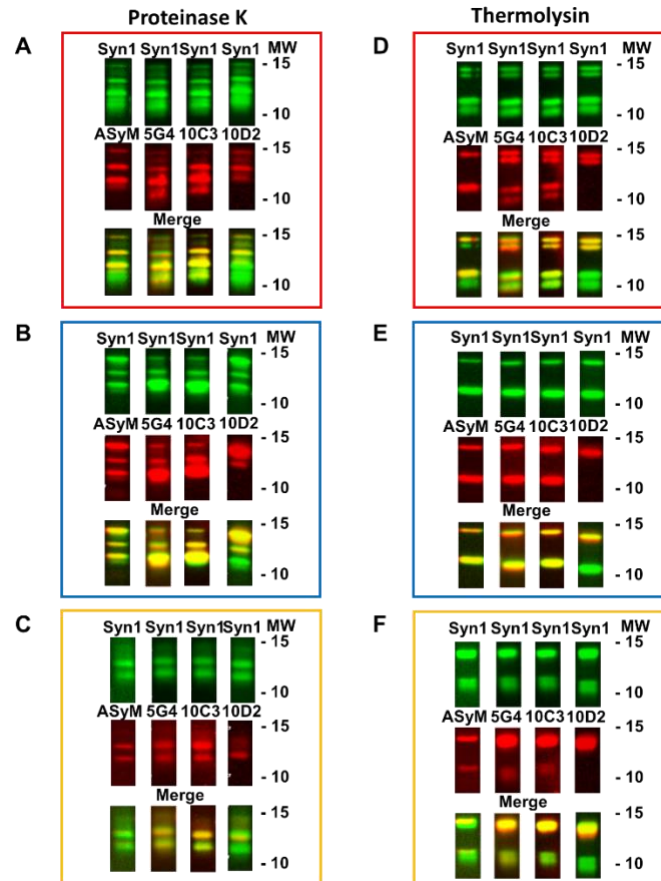


Figure 2: Immunodetection of the proteolytic fragments generated after treatment of aSYN fibrillar polymorphs by Proteinase K or Thermolysin. Fibrils (red), ribbons (blue) and fibrils 91 (yellow) were degraded by proteinase K (A, B, C) or thermolysin (D, E, F) for 15 min. The proteolytic fragments were identified by western blot analysis using the anti-aSYN antibodies Syn, ASyM, 5G4, 10C3 and 10D2 which epitopes span the amino acid stretches 91-99, 1-15, 46-53, 98-105 and 118-127. The molecular weight markers are shown on the left of each panel.

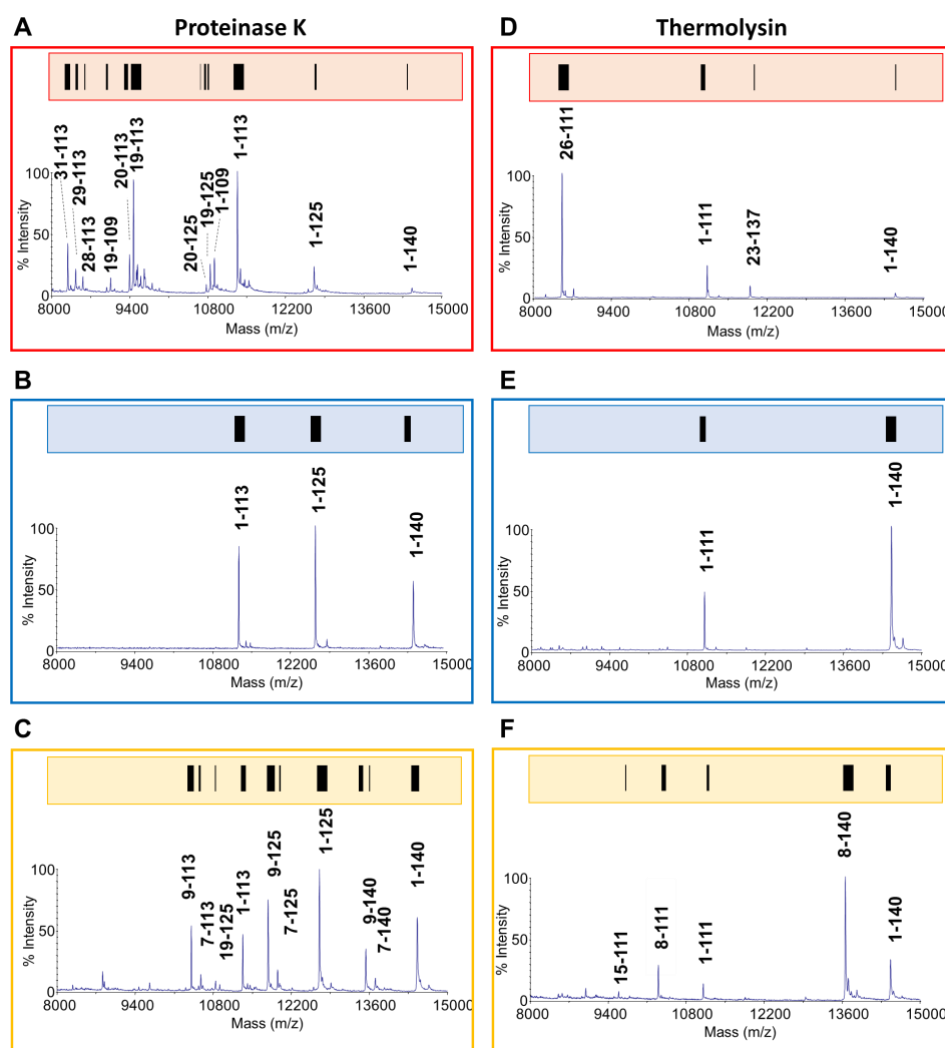


Figure 3: Identification of the proteolytic fragments generated by treatment of aSYN fibrillar polymorphs by Proteinase K and Thermolysin by mass spectrometry. Fibrils (red), ribbons (blue) and fibrils 91 (yellow) were degraded by proteinase K (A, B, C) or thermolysin (D, E, F) for 15 min. MALDI-MS mass spectra of long polypeptides are presented. The identity of each ion is given. Monoprotonated average masses of annotated peptide ions are given in table S1 and S2. The specific MALDI-MS proteolytic profile of each aSYN strain is represented as a bar code on the top of the corresponding mass spectrum where the intensity of each ion is taken into account.

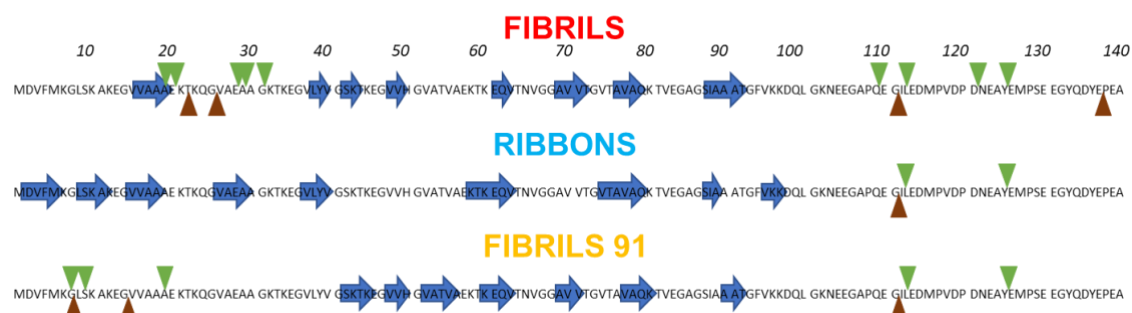


Figure 4: Graphic representation of proteolytic accessibility of aSYN within the fibrillar polymorphs fibrils, ribbons and fibrils 91. The accessible cleavage sites of proteinase K (green arrows) and thermolysin (brown arrows) are indicated along aSYN primary structure for each fibrillar polymorph. Blue arrows represent amino acid stretches that adopt beta strand conformation we previously determined by NMR [27, 29, 30].

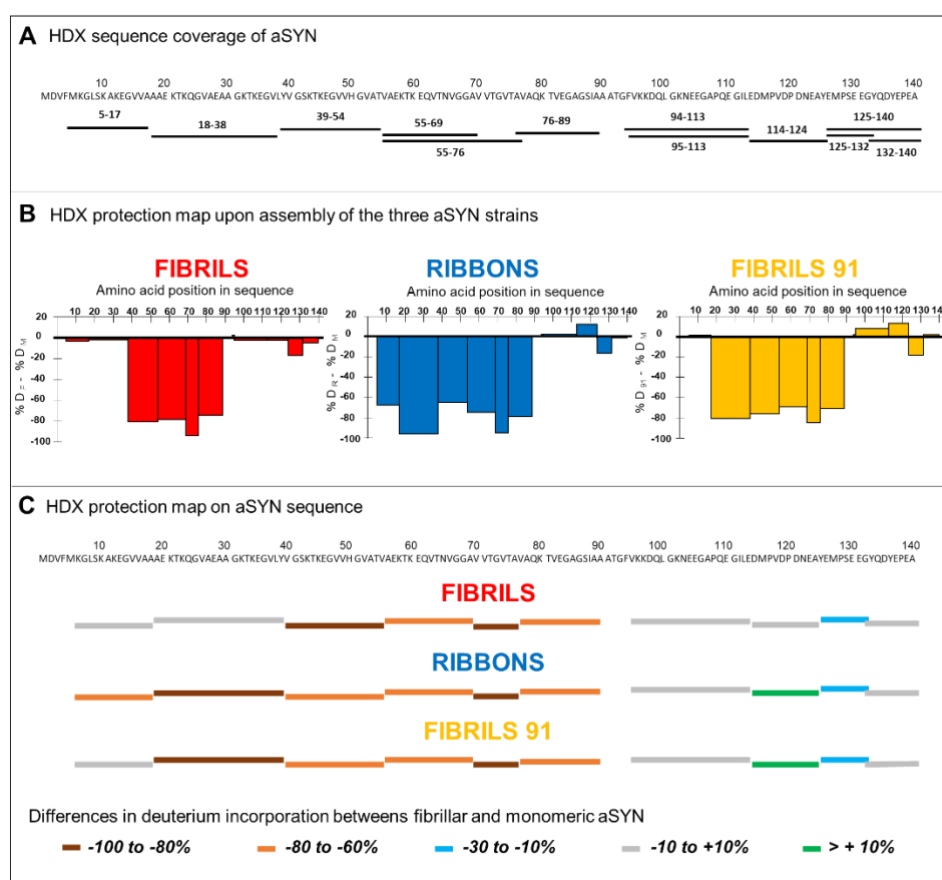


Figure 5: Changes in the exposure of aSYN to the solvent upon assembly into distinct fibrillar polymorphs assessed by hydrogen-deuterium exchange. (A) Sequence coverage of aSYN obtained by pepsin digestion and used for HDX experiments (B) HDX protection maps upon assembly of monomeric aSYN into the fibrillar polymorphs fibrils, ribbons and fibrils 91 were obtained by measuring for each pepsin peptide the difference in deuterium incorporation in monomeric versus fibrillar aSYN polymorphs. (C) HDX protection maps upon assembly of each aSYN into fibrils, ribbons and fibrils 91 with color bars underlining aSYN primary structure showing the difference in deuterium incorporation upon assembly of monomeric aSYN into fibrillar polymorphs summarizes our findings. Regions in white are not covered. The data correspond to the average values of $n = 3$ independent replicates, with a maximum standard deviation of 12% between replicates.

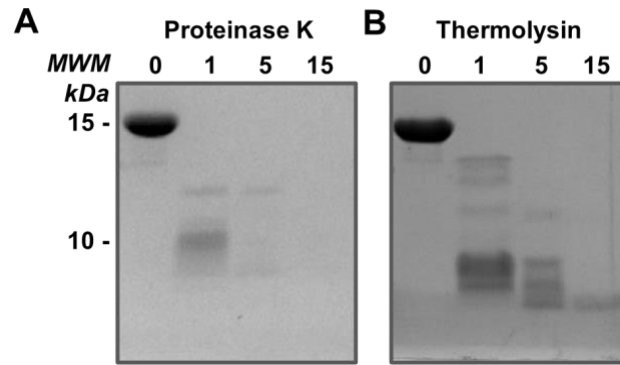


Figure S1: Proteolytic profile of monomeric aSYN. (A) Proteinase K (PK, 3,8 ug/ml) and (B) Thermolysin (Th, 5ug/ml) degradation patterns of monomeric aSYN (100μM) monitored over time on Coomassie stained SDS–PAGE (15%). Time (min) and molecular weight markers (kDa) are shown on the top and left sides of the gels, respectively.

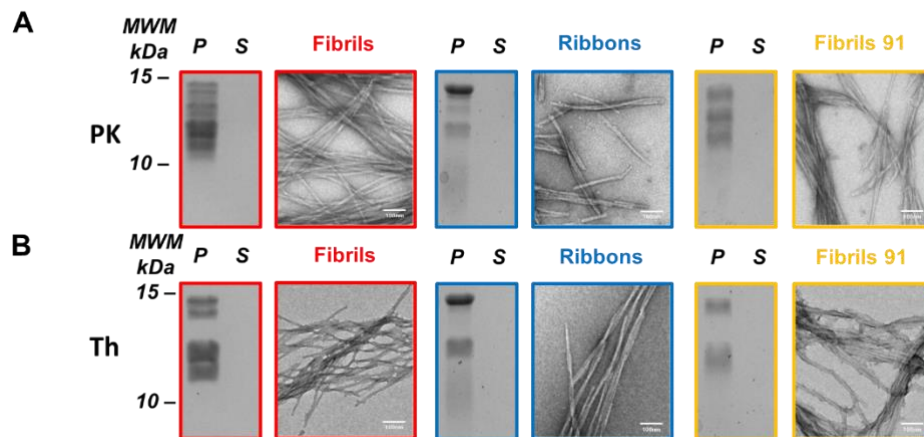


Figure S2: Assessment of aSYN fibrillar polymorphs after treatment with proteinase K or thermolysin. aSyn fibrils, ribbons and fibrils 91 were subjected to proteolysis by proteinase K (A), or thermolysin (B) for 15 minutes. An aliquot of each reaction was imaged by transmission electron microscopy after negative staining with Uranyl Acetate and the rest of the reaction products were spun at 100 000 g (30 min, 20 °C). The resuspended pellets (P) and supernatants (S) were subjected to SDS–PAGE analysis and stained with Coomassie blue. The electron micrographs and PAGE analysis clearly demonstrate the fibrillar nature of the assemblies despite proteolysis. Scale bar: 100nm.

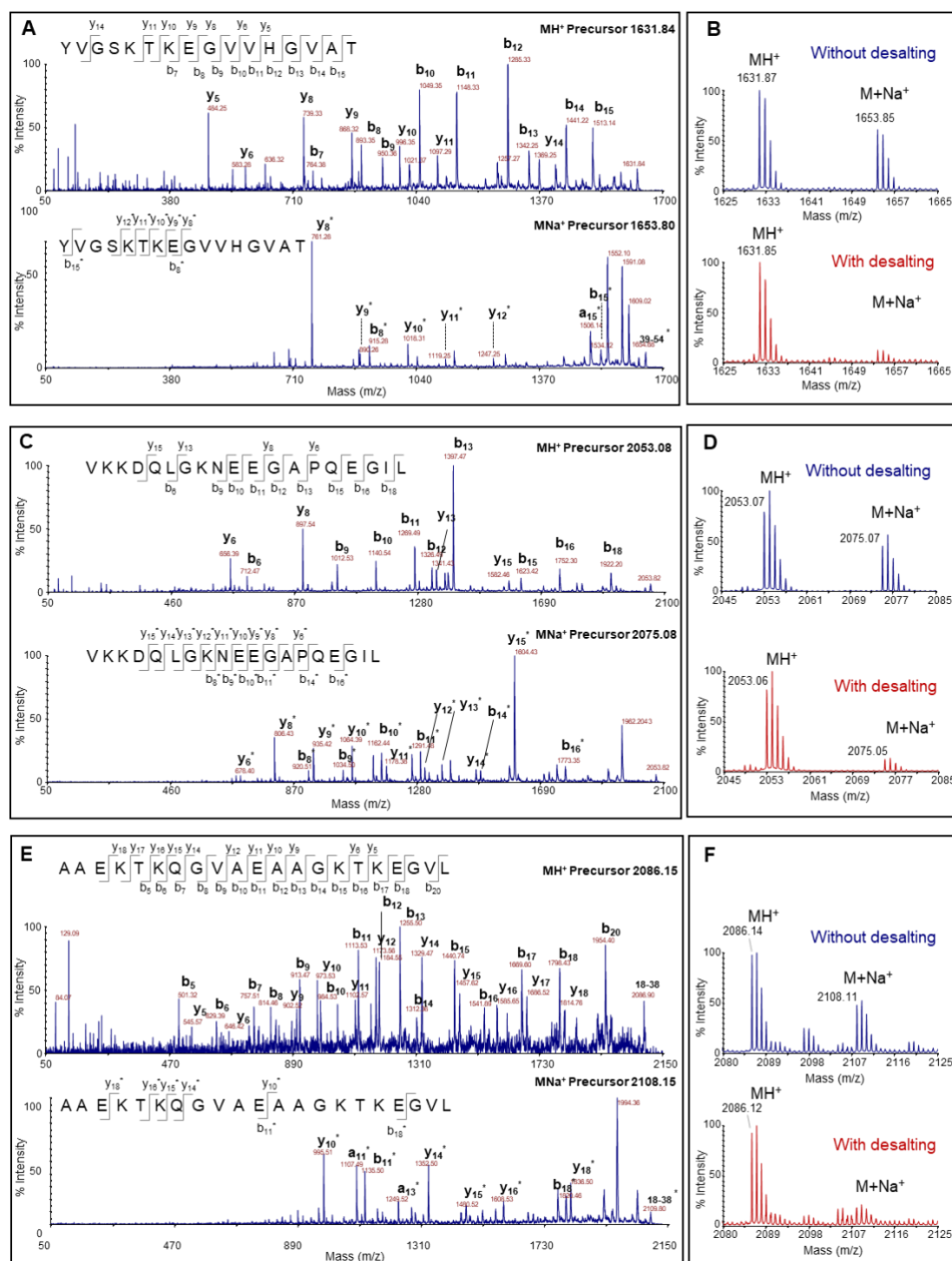


Figure S3: Representative spectra of three pepsin-derived peptides detected as sodium adducts. The fragmentation spectra of both the abundant peptide with a sodium adduct (MNa⁺) and the low abundant monoprotonated (MH⁺) obtained by CID using the MALDI-TOF-TOF allows determining the identity of peptides (A, C, E). MALDI mass spectra before and after desalting of the MALDI sample deposit, using a cold solution of 1% TFA (B, C, E) further confirmed that most of the aSYN pepsin-derived peptides were detected as abundant sodium adducts peptide ions.

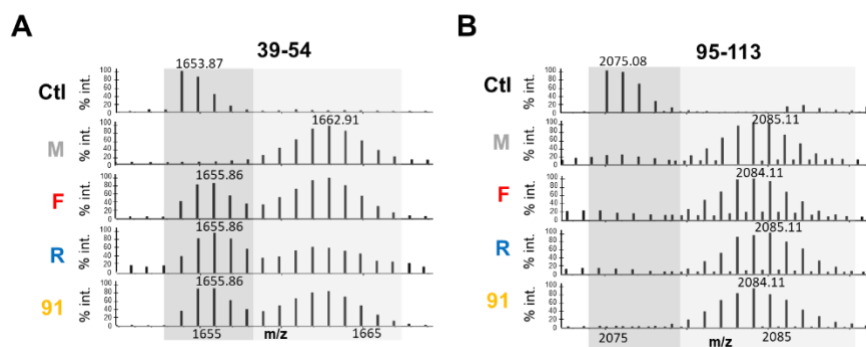


Figure S4: MALDI mass spectra of the peptide 39-54 protected in alpha-synuclein strains (a), and the peptide 95-113 solvent-exposed in alpha-synuclein strains (b) after 30 min deuterium exchange. Mass spectra of the peptides with a sodium adducts are shown for monomers before deuterium incorporation (Ctl) and after 30 min deuterium exchange for monomers (M), fibrils (F), ribbons (R) and fibrils 91 (91). Dark grey boxes contain the peptides that have exchanged few hydrogens and light grey boxes the peptides that have exchanged as much hydrogens as monomers.

Sequence	MH ⁺ _{calc} (Da)	Fibrils			Ribbons		Fibrils 91	
		MH ⁺ _{exp} (Da)	ΔDa		MH ⁺ _{exp} (Da)	ΔDa	MH ⁺ _{exp} (Da)	ΔDa
1-140	14461.2	14462.6	-1.4		14461.0	0.2	14461.4	-0.2
1-135	13871.6	Not detected	-		Not detected	-	Not detected	-
7-140	13709.2	Not detected	-		Not detected	-	13709.6	-0.4
9-140	13539.0	Not detected	-		Not detected	-	13538.6	0.4
4-129	12804.5	Not detected	-		Not detected	-	Not detected	-
1-125	12705.4	12706.6	-1.2		12704.6	0.8	12705.0	0.4
19-140	12597.9	12599.6	-1.7		Not detected	-	Not detected	-
20-140	12526.8	Not detected	-		Not detected	-	Not detected	-
7-125	11953.4	Not detected	-		Not detected	-	11953.1	0.3
9-125	11783.2	Not detected	-		Not detected	-	11783.0	0.2
1-113	11329.0	11330.2	-1.2		11329.6	-0.6	11328.6	0.4
1-109	10916.5	10916.8	-0.3		Not detected	-	10915.0	1.4
19-125	10842.1	10843.2	-1.1		Not detected	-	10841.4	0.7
20-125	10771.0	10772.0	-1.0		Not detected	-	Not detected	-
7-113	10577.0	Not detected	-		Not detected	-	10577.2	-0.2
9-113	10406.8	Not detected	-		Not detected	-	10407.0	-0.2
31-125	9657.9	Not detected	-		Not detected	-	9659.0	-1.1
18-113	9536.8	9538.9	-2.1		Not detected	-	Not detected	-
19-113	9465.7	9467.4	-1.7		Not detected	-	Not detected	-
20-113	9394.6	9396.4	-1.8		Not detected	-	Not detected	-
19-109	9053.2	9055.3	-2.1		Not detected	-	Not detected	-
28-113	8552.7	8554.6	-1.9		Not detected	-	Not detected	-
29-113	8423.5	8425.3	-1.7		Not detected	-	Not detected	-
31-113	8281.4	8283.5	-2.1		Not detected	-	Not detected	-

Table S1 : List of high mass polypeptides generated for each strain after 15 min limited proteolysis using proteinase K. Monoprotonated peptides were identified by comparison of their experimental average mass (MH⁺_{exp}) with theoretical calculated average masses (MH⁺_{calc}) of polypeptides using GPMW software. For masses compatible with several α-synuclein peptides, identification was established using both immunodetection of SDS-PAGE proteolytic profiles with antibodies specific to N- or C-terminal α-synuclein sequences. Mass spectrometric identification of the most abundant small proteolytic peptides, complementary to the high molecular mass peptides, further confirmed the identification of these high mass polypeptides. Mass differences between experimental and calculated masses are indicated (ΔDa).

Sequence	MH ⁺ _{calc} (Da)	Fibrils		Ribbons		Fibrils 91	
		MH ⁺ _{exp} (Da)	ΔDa	MH ⁺ _{exp} (Da)	ΔDa	MH ⁺ _{exp} (Da)	Δ Da
1-140	14461.2	14462.3*	-1.1	14459.2	2	14463.4	-2.2
8-140	13652.2	Not detected	-	Not detected	-	13653.5	-1.2
23-137	11871.1	11872.2	-1.1	Not detected	-	Not detected	-
1-111	11102.7	11102.9	-0.2	11100.9	1.8	11102.7	-0.0
8-111	10293.6	Not detected	-	Not detected	-	10293.6	0.0
15-111	9579.8	Not detected	-	Not detected	-	9579.6	0.2
26-111	8496.5	8496.3	0.2	Not detected	-	Not detected	-

Table S2 : List of high masses polypeptides generated for each strain after 15 min limited proteolysis using thermolysin. Monoprotonated peptides were identified by comparison of their experimental average mass (MH⁺_{exp}) with theoretical calculated average masses (MH⁺_{calc}) of polypeptides using GPMW software. For masses compatible with several α-synuclein peptides, identification was established using both immunodetection of SDS-PAGE proteolytic profiles with antibodies specific to N- or C-terminal α-synuclein sequences. Mass spectrometric identification of the most abundant small proteolytic peptides, complementary to the high molecular mass peptides, further confirmed the identification of these high mass polypeptides. Mass differences between experimental and calculated masses are indicated (ΔDa). Peptides with an asterisk were identified as sodium adduct.

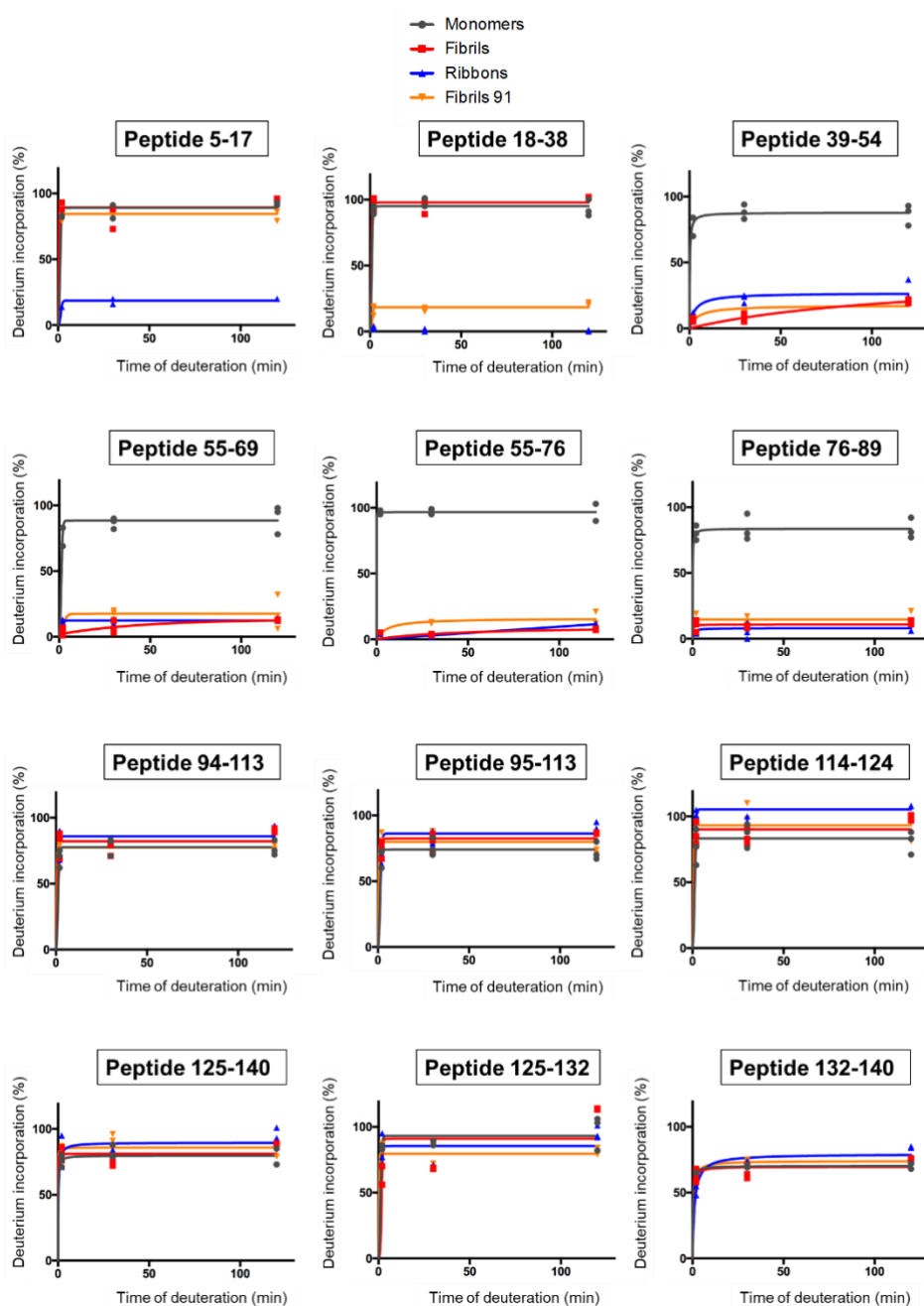
			Monomers		Fibrils		Δ deuteration (F- M)		Ribbons		Δ deuteration (R-M)		Fibrils91		Δ deuteration (91-M)	
M Na ⁺	Peptide	nHtot	nD	%D	nD	%D	Δ D	Δ % D	nD	%D	Δ D	Δ % D	nD	%D	Δ D	Δ % D
1486.83	4-17	13	-	-	11.02	85%	-	-	1.98	15%	-	-	11.70	90%	-	-
1339.73	5-17	12	10.37	86%	10.01	83%	-0.36	-3%	2.11	18%	-8.26	-68%	10.29	86%	-0.08	0%
1023.59	8-17	9	7.59	84%	-	-	-	-	1.85	21%	-5.74	-63%	-	-	-	-
1094.63	8-18	10	8.56	86%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2108.15	18-38	20	19.45	97%	19.01	95%	-0.44	-2%	0.15	1%	-19.3	-96%	3.26	16%	-16.19	-81%
1837.04	21-38	17	16.85	99%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1653.87	39-54	15	13.19	88%	1.07	7%	-12.12	-81%	3.41	23%	-9.78	-65%	1.83	12%	-11.36	-76%
1552.79	55-69	14	12.10	86%	0.98	7%	-11.12	-79%	1.60	11%	-10.5	-75%	2.44	17%	-9.66	-69%
2180.15	55-76	21	20.42	97%	0.60	3%	-19.82	-94%	0.46	2%	-19.96	-95%	2.61	12%	-17.81	-85%
1323.68	76-89	13	10.89	84%	1.18	9%	-9.71	-75%	0.60	5%	-10.29	-79%	1.70	13%	-9.19	-71%
2222.16	94-113	18	14.27	79%	14.39	80%	+0.12	+1%	14.59	81%	+0.32	+2%	14.57	81%	+0.30	+2%
2075.07	95-113	17	12.97	76%	12.55	74%	-0.42%	-2%	13.32	78%	+0.35	+2%	14.34	84%	+1.87	+8%
1253.47	114-124	7	6.06	87%	5.92	85%	-0.14	-2%	6.94	99%	+0.88	+12%	7.03	100%	+0.97	+13%
963.34	125-132	6	5.28	88%	4.15	70%	-1.13	-18%	4.24	71%	-1.04	-17%	4.22	70%	-1.06	-18%
1958.74	125-140	13	10.74	83%	9.92	76%	-0.82	-12%	10.77	83%	+0.03	0%	11.92	92%	+1.18	+9%
1093.40	132-140	7	4.94	71%	4.61	66%	-0.33	-5%	5.05	71%	+0.11	0%	5.20	73%	+0.26	+2%

Table S3: Deuterium incorporations after 30min HDX for each pepsin-derived peptide measured for aSYN monomers (M), fibrils (red), ribbons (blue) and fibrils 91 (yellow). For each peptide analyzed in HDX the table gives: the monoisotopic mass of the peptide with a sodium adduct (MNa⁺), the segment of the peptide sequence (Peptide), the total number of exchangeable hydrogens (nHtot), the average number of incorporated deuteriums (nD), the average % of deuterium incorporation (%D, considering 43% of back exchange), and the difference of deuterium incorporation (ΔD and Δ%D) between fibrillary and monomeric aSYN. Data correspond to the average values of n = 3 independent replicates, with a maximum standard deviation of 12% between replicates.

M Na ⁺	Peptide	nH _{tot}	Monomers	
			nD	%D
1486.83	4-17	13	-	-
1339.73	5-17	12	9.87	82%
1023.59	8-17	9	7.02	78%
1094.63	8-18	10	8.37	84%
2108.15	18-38	20	18.41	92%
1837.04	21-38	17	16.29	96%
1653.87	39-54	15	11.90	79%
1552.79	55-69	14	10.97	78%
2180.15	55-76	21	20.27	97%
1323.68	76-89	13	10.42	80%
2222.16	94-113	18	12.59	70%
2075.07	95-113	17	12.41	73%
1253.47	114-124	7	5.39	77%
963.34	125-132	6	5.08	84%
1958.74	125-140	13	9.88	76%
1093.40	132-140	7	4.94	71%

Table S4: Deuterium incorporations after 30min HDX for each pepsin-derived peptide measured for aSYN monomers (M). For each peptides analyzed in HDX are given: the monoisotopic mass of the peptide with a sodium adduct (MNa⁺), the segment of the peptide sequence, the total number of exchangeable hydrogens (nH_{tot}), the average number of incorporated deuteriums (nD), the average % of deuterium incorporation (%D, considering 43% of back exchange). Data correspond to the average values of n = 3 independant replicates, with a maximum standard deviation of 12% between replicates.

Annexe 1



Kinetics of deuterium incorporation into aSYN monomers and fibrillar polymorphs. The kinetics of deuterium incorporation is plotted for each aSYN peptide (see figure 5) obtained by pepsin treatment as a function of the incubation time of aSYN monomers (grey), fibrils (fibrils), ribbons (blue) and Fibrils91 (yellow) in D₂O. Individual data points from three independent experiments are presented. HX was performed at 22°C following a 1:20 dilution of the protein samples (0.7 mg/ml) in D₂O.

2. Etude du processing de souches d'alpha-synucléine par les astrocytes et les neurones

Puisque, comme nous l'avons vu dans notre première étude, les fibres, les rubans et les fibres 91 présentent des différences d'accessibilité *in vitro* au niveau de leur région N-terminale, nous avons voulu vérifier si ces différences persistaient dans un contexte plus complexe et plus physiologique. Nous avons donc utilisé des cultures primaires d'astrocytes et de neurones que nous avons exposées à ces souches afin d'analyser si :

- Les différences d'accessibilité des souches engendrent des conséquences fonctionnelles, en termes d'internalisation et de dégradation par les cellules,
- Les protéases cellulaires sont capables de tronquer de manière différentielle les souches d'alpha-synucléine, à la manière d'une "protéolyse ménagée cellulaire".

Les résultats montrent que les assemblages d'alpha-synucléine sont internalisés par les cellules de manière différentes en fonction de la souche. En effet, après 2 heures d'exposition, les rubans sont présents en quantité statistiquement supérieure dans les neurones et les astrocytes par rapport aux fibres et aux fibres 91. Ce résultat suggère que les différences d'accessibilité des souches au niveau de la région N-terminale de l'alpha-synucléine influencent fortement leurs efficacités d'internalisation par les cellules.

Ces différences sont moins marquées concernant la dégradation des assemblages par les cellules. En effet, nous avons établi une cinétique de dégradation qui montre une diminution plus importante de la quantité d'alpha-synucléine dans les astrocytes exposés aux fibres 91 après 24 heures mais qui n'est plus observé après 48 heures. Cependant, de manière très intéressante, nous avons observé que les astrocytes, contrairement aux neurones, dégradent efficacement les agrégats d'alpha-synucléine au cours du temps.

L'analyse des formes tronquées de l'alpha-synucléine générés par les neurones et les astrocytes montrent que l'alpha-synucléine est protéolysée au niveau de la région C-terminale quel que soit la souche. Ce résultat est en accord avec la conclusion de notre première étude montrant que cette extrémité est fortement accessible pour chacune des souches d'alpha-synucléine. Nous n'avons cependant pas pu ni mettre en évidence ni réfuter l'accessibilité de la région N-terminale des assemblages d'alpha-synucléine dans un contexte cellulaire.

Cette étude nous permet donc de confirmer que les différents assemblages présentent des caractéristiques fonctionnelles spécifiques, en termes d'internalisation par les cellules notamment. Nous confirmons également ici que l'extrémité C-terminale des différentes souches d'alpha-synucléine étudiées est hautement accessible à la fois *in vitro* et *in cellulo*. La mise en place d'analyses des formes tronquées de l'alpha-synucléine dans les cellules par des techniques plus précise, comme l'électrophorèse bi-dimensionnelle associée à une identification des peptides par spectrométrie de masse permettrait de préciser les sites de coupures voir de mettre en évidence d'autres type de troncatures de l'alpha-synucléine.

De manière intéressante, nous avons également montré l'implication importante des astrocytes dans la dégradation des assemblages d'alpha-synucléine pour les trois souches étudiées. Cette fonction des astrocytes a été mise en évidence très récemment par différentes équipes et pourrait devenir une cible thérapeutique potentielle (*Tsunemi et al., 2020, Filippini et al., 2020*). Il serait intéressant d'étudier si cette dégradation par les astrocytes se déroule via les lysosomes ou via le système ubiquitine-protéasome dans une optique de stimuler cette dégradation et d'ainsi potentiellement diminuer la quantité d'agrégats d'alpha-synucléine présente dans le cerveau de patients.

Internalization and degradation of different alpha-synuclein strains by neurons or astrocytes

Maud Landureau¹, Stéphanie Eyquem², Ronald Melki¹

¹ Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Institut Francois Jacob (MIRCen), CNRS, CEA, University Paris-Saclay, 92260 Fontenay-Aux-Roses cedex, France.

²Sanofi R&D, Rare & Neurologic Diseases Research Therapeutic Area, Neurodegeneration Research, 1 Avenue Pierre Brossolette, Chilly Mazarin 91380, France.

*Corresponding author: Ronald Melki

E-mail: ronald.melki@cns.fr

ABBREVIATIONS

DLB: Dementia with Lewy Bodies

GFAP: Glial Fibrillary Acid Protein

MSA: Multiple System Atrophy

PD: Parkinson's Disease

ABSTRACT

Multiple studies have highlighted the role of alpha-synuclein assemblies in Parkinson's disease and associated synucleinopathies. Recent work demonstrated that alpha-synuclein can assemble into distinct fibrillar polymorphs named strains which differed structurally.

Here we investigated the internalization and the degradation of three alpha-synuclein strains; the fibrils, the ribbons and the fibrils 91, by neuronal or astrocytic primary cell cultures.

We firstly establish that the efficiency of alpha-synuclein polymorphs internalization by cells is strain-dependent. Indeed, ribbons are more easily internalized by astrocytes and neurons than the other strains. We then showed that strains are differentially sensitive to cell degradation and especially that fibrils 91 are much less resistant to degradation than the other strains. Moreover, we identified a preponderant role of astrocytes in the degradation of alpha-synuclein assemblies. Astrocytes clear these assemblies by generating C-terminal alpha-synuclein truncated forms. This is consistent with the fact that this region is especially accessible in the three strains.

To conclude, this study provides evidence that the differences in the exposed surfaces of distinct strains lead to functional specificities which could explain in part the diversity of synucleinopathies.

INTRODUCTION

Synucleinopathies

Parkinson's disease (PD), multiple system atrophy (MSA) and dementia with Lewy bodies (DLB) are neurodegenerative diseases grouped under the terms of « synucleinopathies ». They are characterized by the intracerebral accumulation of a misfolded protein, alpha-synuclein, which forms insoluble fibrils. These alpha-synuclein fibrils are the major constituent of the aggregates found in the brain of patients (*Spillantini et al., 1998, Goedert 2001*). These aggregates invade the patients' brain over time following a stereotypical pathway of spatial progression that might depend of the synucleinopathy considered (*Braak et al., 2003, 2004, Beach et al., 2009, Kantarci et al. 2010*).

Alpha-synuclein strains

In recent years, several studies have shown that alpha-synuclein can assemble into structurally different type of fibrils, named strains, and different strains have been detected in the brains of patients *post-mortem* (*Spillantini et al., 1998, Peng et al., 2018, Shahnawaz et al., 2020, Strohäker et al., 2019, Van der Perren et al., 2020*). The differences in folding between strains leads to differences in term of surface exposed

to the solvent. Because the regions of surface are directly in contact with their environment, they influence the binding of alpha-synuclein assemblies to protein or lipidic partners, leading potentially to strain-specific toxicity (*Peelaerts et Baekelandt, 2016, 2015, Melki, 2018*). This phenomenon could explain, at least in part, the heterogeneity between synucleinopathies.

We have recently determined the surface of three alpha-synuclein strains assembly *in vitro* named fibrils, ribbons and fibrils 91 (*Landureau et al. 2021*). We have demonstrated that these three strains are equally accessible at their C-termini extremities but present important accessibility differences at their N-termini extremities. Actually, fibrils show accessibility until the amino acid 38, fibrils 91 until the amino acid 19 and ribbons are totally inaccessible at this region. Interestingly, it has been shown that our strain named « fibrils » display a surface close to that of alpha-synuclein assemblies found in DLB patients' brain and that the strain « ribbons » exhibit a surface close to alpha-synuclein assemblies found in PD or MSA patients' brain (*Van der Perren et al., 2020*).

Aim of the study

Here we explored the internalization and the degradation of these three alpha-synuclein strains by pure neuron or astrocyte primary rat cultures. We chose these cells types because:

- a. neurons are the most affected cells in synucleinopathies (*Goedert et al., 2017*)
- b. astrocytes are able to degrade alpha-synuclein aggregates (*Lee et al., 2008, Loria et al., 2017, Tsunemi et al., 2020, Filippini et al., 2020*).

We first wanted to determine whether differences in the surface exposed by alpha-synuclein strains lead to distinct functional characteristics, in term of fibrils internalization and degradation. Hence, differences at the surface of strains could in part explain differences observed between synucleinopathies, particularly about the brain propagation kinetics. We showed that ribbons are more easily internalized by astrocytes and neurons than the other strains. Moreover, fibrils 91 are significantly more sensitive to degradation than ribbons or fibrils after 24 hours of processing. These results are useful to understand the physiopathology of synucleinopathies and supports the assumption that alpha-synuclein strains could explain the heterogeneity of synucleinopathies.

We secondly identified the alpha-synuclein truncated forms generated by cells exposed to the strains in order to investigate whether the assemblies' accessible regions defined *in vitro* are still accessible *in cellulo*. More precisely, we used the cells machinery to perform a "physiological limited proteolysis". Similarly to *in vitro* conditions, cellular enzymes will access first the regions exposed to the solvent, and

based on our previous work, we expected the extremities of alpha-synuclein proteins to be degraded. Our results confirmed that the C-termini extremity of the three alpha-synuclein strains defined as accessible *in vitro* are still accessible *in cellulo*. However, we could not find any N-terminal truncated forms of alpha-synuclein in cells in our model although N-termini extremities of fibrils and fibrils 91 were defined *in vitro* as solvent-exposed regions. This result suggests that the N-termini of the assemblies are not accessible anymore, possibly by interacting with endogenous cellular components, or that the cellular proteases are unable to degrade the N-terminal extremity of alpha-synuclein assemblies.

RESULTS

Set up and control of alpha-synuclein strains and of the quality and cells cultures:

We generated pure rat cortical primary cells culture of neurons and astrocytes. We maintained these cells culture during 13 days in order to obtain mature neurons or astrocytes. After 13 days, we exposed them to 1uM of monomers, fibrils, ribbons or fibrils 91 of alpha-synuclein for two hours to allow for maximal alpha-synuclein internalization. In order to analyze only the alpha-synuclein internalized by cells, we changed the medium after two hours and we recovered the cells after 0 hour, 24 hours or 48 hours.

The structure of alpha-synuclein strains used have been controlled by limited proteolysis with proteinase K (Figure 1 a). The profiles obtained correspond to the profiles previously described for these three strains (*Bousset et al., 2013, Shrivastava et al., Rey et al. 2020, Landureau et al., 2021*).

We controlled the integrity and the viability of neurons and astrocytes by fluorescent microscopy in presence of trypan blue (Figure 1 b). We therefore controlled the purity of our primary neurons cultures by detecting GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), a specific marker of astrocytes, in our cells cultures lysates by western blotting. We detected an important labelling of GFAP-signal in astrocytes lysates but almost none in neurons, indicating that neuronal cultures were not contaminated by astrocytes (Figure 1 c).

We also controlled the quantity of the different forms of alpha-synuclein added to the culture by western blotting the medium added to the cells (Figure 1 d). We confirmed that the quantity of alpha-synuclein proteins added to the cells was equal for each alpha-synuclein form and each replicate.

We finally verified that the culture medium alone was not able to degrade alpha-synuclein monomers or strains. After 48 hours of exposition, we did not see any

degradation of monomeric alpha-synuclein or alpha-synuclein strains by the medium alone (Figure 1 e) indicating that the culture medium does not have any influence on alpha-synuclein

degradation.

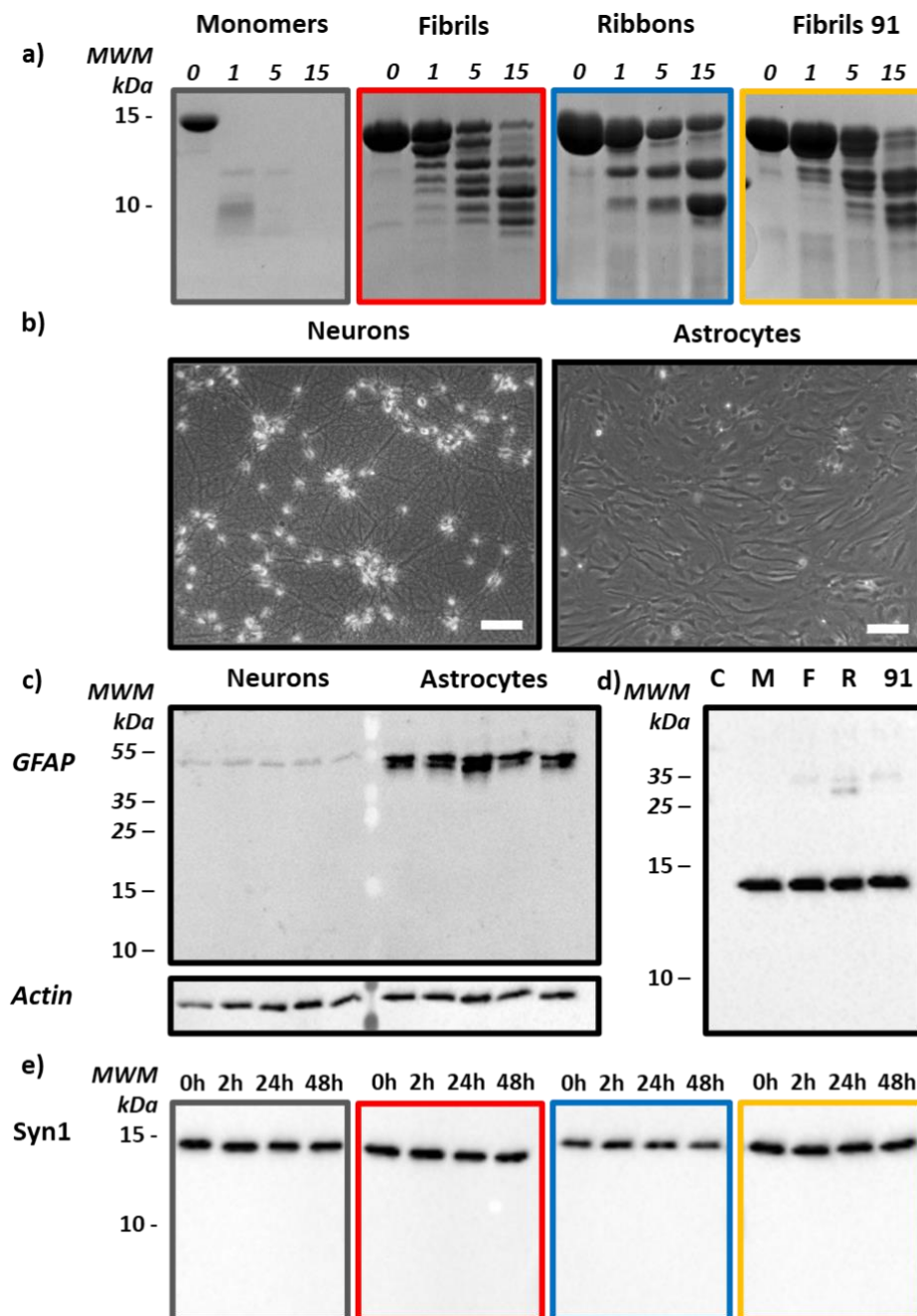


Figure 1: Set up and control of alpha-synuclein strains and cells cultures:

Limited proteolysis profiles of alpha-synuclein monomers (in grey), fibrils (in red), ribbons (in blue) or fibrils 91 (in orange) digested by proteinase K during 0, 1, 5 or 15 minutes (a). Control of the morphology and viability of neurons and astrocytes

primary culture by fluorescent microscopy after 13 days of culture. Scale bar = 100um (b). Control of the absence of astrocytes in neurons primary culture by western blotting using the antibody anti-GFAP (Glial fibrillary acid protein), an astrocyte specific protein (c). Control of quantity of the different forms of alpha-synuclein added to the cells (C : control = PBS, M : monomeres, F : fibrils, R : ribbons, 91 : fibrils 91) by western blotting using the antibody Syn1 (d). Western blot using the antibody anti alpha-synuclein Syn1 demonstrating the absence of degradation of the different forms of alpha-synuclein by the culture medium after 0h, 2h, 24h or 48h of incubation (e).

Internalization of alpha-synuclein strains by cells:

At first, we studied the internalization of alpha-synuclein strains by neurons and astrocytes. We recovered the cells 2 hours after exposure to alpha-synuclein strains. Cells lysates were then analyzed by western blotting and we used the antibody Syn1 to detect alpha-synuclein (Figure 2).

Results showed that ribbons are significantly more internalized by astrocytes than the others strains. Ribbons are also significantly more internalized by neurons than monomers and fibrils. We observed that fibrils 91 tend to be more internalized by astrocytes and neurons than fibrils, although the difference have not reached statistical significance. Monomers seem to be less internalized by cells. However, alpha-synuclein monomers easily diffuse at the surface of the cell membrane and reach rapidly an equilibrium between alpha-synuclein endocytosis and exocytosis. Moreover, monomers are easily cleared by cells (*Lee et al., 2008*). These two effects explain the small amount of alpha-synuclein observed in cells exposed to monomers. Alpha-synuclein internalization by neurons or astrocytes had also been visualized by fluorescent microscopy with comparable results (figure S1).

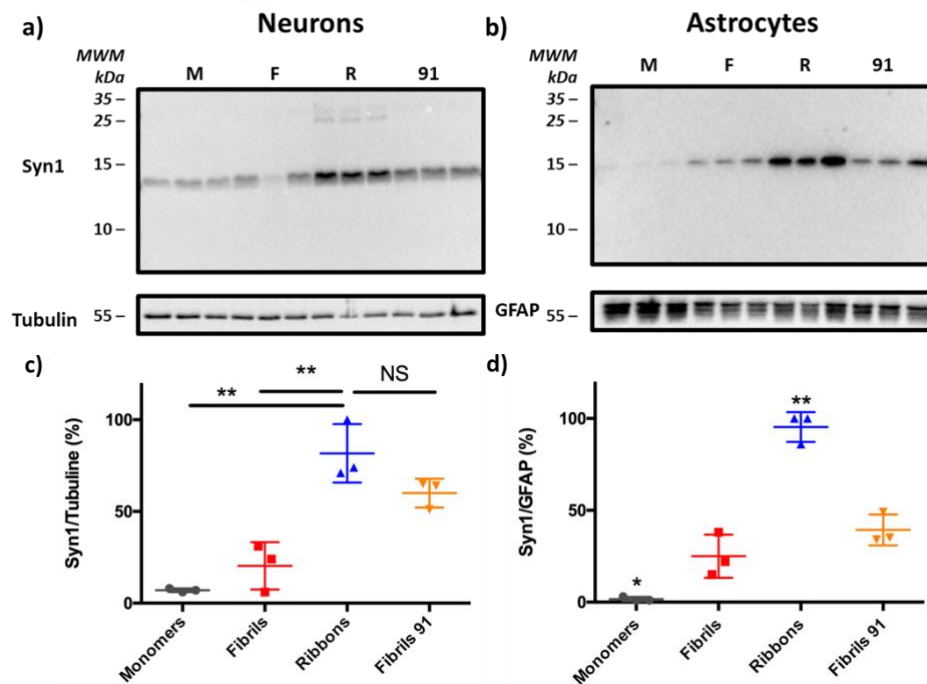


Figure 2: Internalization of alpha-synuclein by neurons and astrocytes

Detection of alpha-synuclein protein in neuronal (a) and astrocytic (b) lysates after 2 hours of exposure to assemblies by western blotting. Alpha-synuclein is detected by the antibody anti-alpha-synuclein Syn1. Quantification of alpha-synuclein quantity in cells lysate (Syn1/ tubulin in % for neurons (c) or Syn1/GFAP in % for astrocytes (d)) is performed using Kruskal-Wallis test, * $p < 0.05$.

Alpha-synuclein degradation by cells:

We then looked at the kinetic of degradation of alpha-synuclein strains by astrocytes or by neurons after 2, 24 or 48 hours of processing. Results show that in neurons exposed to alpha-synuclein fibrils or ribbons, there is no decrease of alpha-synuclein quantity after 48 hours of processing, even a slight increase probably due to a residual persistence of alpha-synuclein in the medium. However, we can observe a reduction of the amount of alpha-synuclein in neurons exposed to fibrils 91 after 48 hours of processing, suggesting that this strain is particularly sensitive to degradation by neurons. We also detect an important decrease of alpha-synuclein levels in neurons exposed to monomers for 2h to 24 hours (Figure 3)

In astrocytes, we observe a significant decrease of total alpha-synuclein over time in cells exposed to the three strains. The kinetic of alpha-synuclein decrease differs between strains. Indeed, this decrease is particularly important for astrocytes exposed to fibrils 91 after 24 hours, supporting that this strain is highly sensitive to degradation

and that the degradation of alpha-synuclein aggregates is strain-dependant. However, between 24 hours and 48 hours of processing, we observe a real decrease of alpha-synuclein only in the astrocytes exposed to the ribbons (Figure S1). The important decrease of alpha-synuclein in astrocytes exposed to monomers, fibrils, ribbons or fibrils 91 confirmed that astrocytes are greatly involved in the degradation of alpha-synuclein assemblies, much more than neurons. Western blot with 3 replicates for each condition are presented Figure S2.

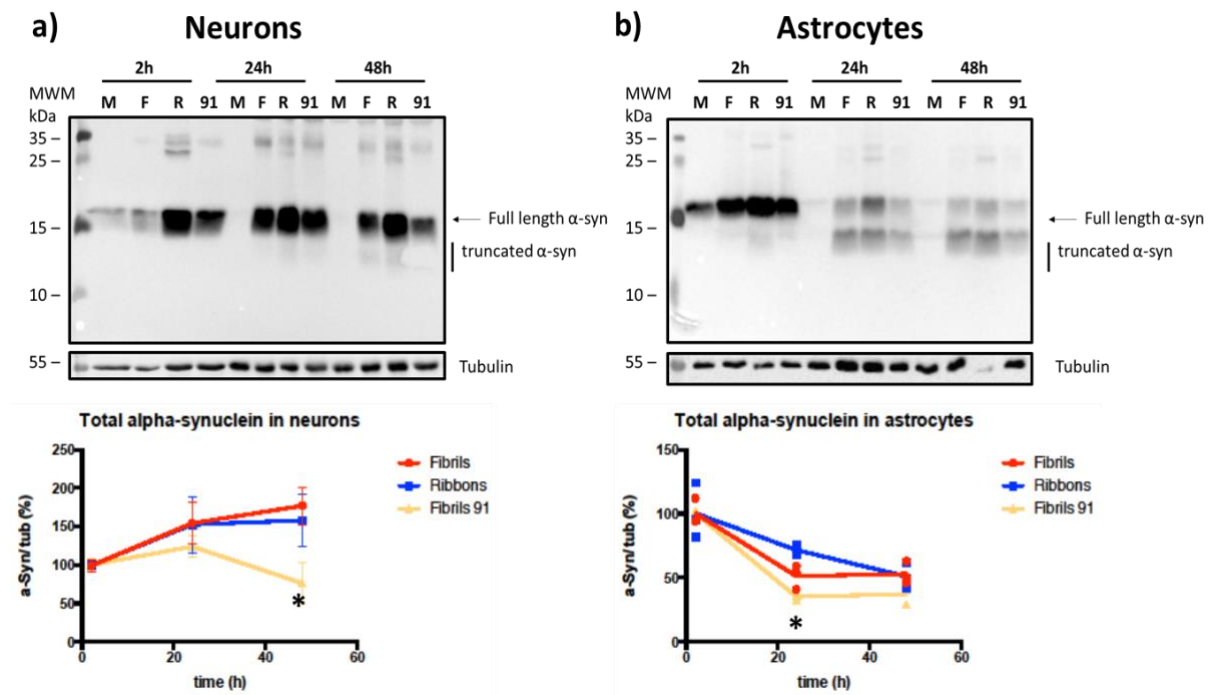


Figure 3: Alpha-synuclein degradation by neurons and astrocytes.

Alpha-synuclein levels in neuron (a) and astrocytes (b) lysates after exposure to 1 μM of monomeric alpha-synuclein or of strains during 2 hours after 0h, 24h or 48h of processing. Alpha-synuclein was detected by western blot with the antibody anti alpha-synuclein (4B12) (C : control = PBS, M : monomers, F : fibrils, R : ribbons, 91 : fibrils 91). Respective quantification of total alpha-synuclein (full length and truncated forms) detected by western blot, n=3. Kruskal-Wallis test, *p<0.05

Truncated forms generated

We finally looked at the truncated forms of alpha-synuclein generating by cells exposed to the three strains after 48 hours of processing. This identification will allow us to define the accessible regions of each alpha-synuclein strain after their uptake by cells.

We performed western-blotting using several monoclonal antibodies targeting the N-terminus (ASYM, AA 1-15), the C-terminus (10D2, AA 118-127) or the NAC (Syn1, AA 91-99) region of alpha-synuclein. We observed that the antibody 10D2, which bind alpha-synuclein between amino acids 118 to 127, did not detect any band at a lower molecular weight corresponding to truncated alpha-synucleins in the lysate of neurons or astrocytes. This result indicates that truncated forms of alpha-synuclein are C-terminally truncated in the three strains (Figure 4). However, we did not observe any differences of labelling between the membrane exposed to Syn1 or to ASYM indicating that there is no N-terminal truncated forms of alpha-synuclein in cells exposed to the fibrils, the ribbons or the fibrils 91.

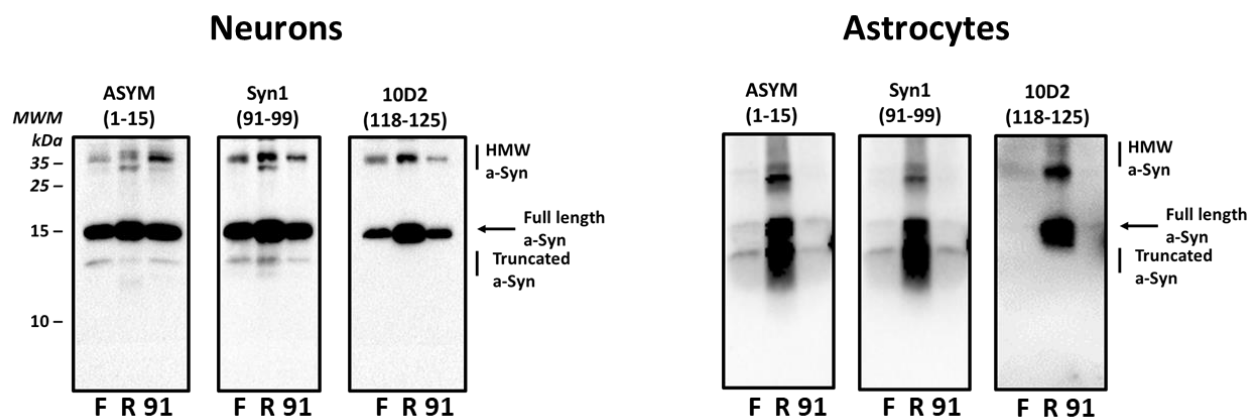


Figure 4: Identification of alpha-synuclein truncated forms

Identification of alpha-synuclein truncated forms in neurons (a) or astrocytes (b) after 48 hours of processing using western blotting with the monoclonal antibody ASYM (1-15), Syn1 (91-99) and 10D2 (118-127).

DISCUSSION

In this study, we investigated the internalization and the clearance of different alpha-synuclein strains by neurons and astrocytes using rat pure primary cultures.

Alpha-synuclein internalization by astrocytes and neurons depend of the strain

We demonstrated that alpha-synuclein polymorphs internalization is strain-dependent and especially that ribbons are internalized more efficiently than other strains by astrocytes and, to a lesser extent by neurons.

It has been demonstrated that the N-terminal region of alpha-synuclein is involved in cells membrane binding and internalization (Ahn et al., 2006). The three strains we

studied here present vastly different surface accessibility at their N-termini extremity (*Landureau et al., 2021*). Given that the accessibility of the N-terminal region of ribbons radically differs from the other strains, it makes sense that they stand out in terms of internalization. In fact, the N-terminal region of ribbons is fully inaccessible while that of fibrils and of fibrils 91 are accessible until the amino acid 38 and 19 respectively. However, we could have expected the opposite effect. Maybe the N-terminal folding of ribbons influence their internalization by an indirect way. A recent study demonstrated that an extracellular protein, the clustering, interacts with alpha-synuclein pre-formed-fibrils and inhibits their internalization by astrocytes (*Filippini et al., 2020*). We can imagine that this protein has a better affinity for fibrils and fibrils 91, due to their N-termini accessibility, and limits their internalization, explaining the better internalization of ribbons. Another argument for the implication of the N-terminal inaccessibility in the facilitation of alpha-synuclein strain internalization by cells is that fibrils 91, which present a less extend N-terminal accessibility than fibrils also present a better internalization than fibrils by astrocytes and neurons.

Alpha-synuclein degradation by astrocytes

The role of astrocytes in neurodegenerative diseases has gained attention recently (*Tsunemi et al., 2020, Sidoryk-Wegrzynowicz et Struzynska 2021*) and, because of their ability to degrade alpha-synuclein fibrils, astrocytes should be considered as a potential drug targets to reduce or prevent pathology development and propagation.

In fact, recent work by our group and others have shown that astrocytes were very efficient at degrading alpha-synuclein fibrils, unlike neurons (*Loria et al., 2017, Lee et al., 2008*). However, both studies investigated only one type of fibrils. Here, we compared the ability of neurons and astrocytes to degrade three different strains and demonstrated that degradation efficiency depends on the strain used.

The fibrils 91 are more easily degraded than others strain by astrocytes and neurons. This difference in term of degradation of strains can be assigned to the surface specificity of each strains which allow, more or less, proteases fixation depending on the strain. The mechanisms involved in the degradation of strains will need to be determined more precisely in the future. In addition, alpha-synuclein is no longer detected after 24 hours in astrocytes exposed to monomers testifying the ease of these cells to degrade monomeric forms of the protein.

Alpha-synuclein degradation by neurons

We did not detect a decrease in alpha-synuclein levels after 48 hours of processing in neurons exposed to fibrils or ribbons. However, we observed a slight reduction of alpha-synuclein in neurons exposed to fibrils 91 confirming that this strain is particularly sensitive to degradation. We also detected some truncated forms of alpha-

synuclein in neurons exposed to the three strains, implying that neurons try to degrade these aggregates but with a lower efficiency. Neurons seem to have great difficulties to clear alpha-synuclein assemblies. In contrast, alpha-synuclein is no longer detected after 24 hours in cells exposed to monomers, suggesting that monomeric and alpha-synuclein assemblies are cleared by different pathway in neurons.

Truncated alpha-synuclein in astrocytes and neurons

We have identified C-terminal truncated forms of alpha-synuclein in neurons or astrocytes after 48 hours of processing. This result confirms that the C-termini extremity of the three strains, which are very accessible *in vitro*, are still accessible in cells. However, we could not detect N-terminal forms of alpha-synuclein in cells exposed to fibrils or fibrils 91 despite this region appears exposed to the solvent *in vitro* for these two strains. Either the N-terminal extremity is no longer accessible because of its binding to proteins or lipids partners or neither neurons or astrocytes are able to efficiently degrade the N-terminal extremity of alpha-synuclein.

Perspectives

This *in cellulo* study demonstrate that different strains, which present different surfaces, exhibit strain-specific properties in terms of internalization and resistance to degradation. This result supports the assumption that the existence of strains could explain the heterogeneity of synucleinopathies (*Peelaerts et al., 2015, Rey et al., 2019*).

Strains' resistance to degradation and strains' internalization ability by neurons and astrocytes will act together to influence strain propagation. Interestingly, Rey et al., demonstrated that, three months after their injection in the olfactory bulb of mice, ribbons and fibrils 91 displayed a significantly higher density of phospho-serine 129 alpha-synuclein positive inclusions in this brain region than fibrils. This could be related to the higher propensity of ribbons and fibrils 91 to be internalized by neurons (*Rey et al., 2019*). Rey et al. also showed that ribbons-induced inclusions disappeared rapidly from the injection site. This phenomenon could be assigned to the high propensity of ribbons to be internalized by astrocytes which are involved in alpha-synuclein clearance.

We also confirmed the predominant role of astrocytes in the clearance of alpha-synuclein assemblies (Tsunemi et al., 2020, Loria et al., 2017, Lee et al., 2008). From a therapeutic perspective, we could attempt to stimulate the degradation of alpha-synuclein aggregates by astrocytes to protect the brain from alpha-synuclein aggregates accumulation.

Finally, we demonstrated that C-termini extremities, but not N-termini, of the three strains studied are accessible *in cellulo*. This could help to design therapeutic molecules that would target this region specifically.

METHODS

Production and aggregation of recombinant alpha-synuclein

Recombinant alpha-synuclein production and assembling into fibrils, ribbons and fibrils 91 was performed as previously described (*Rey et al., 2019, Landureau et al., 2021*) . All samples were ultracentrifugated at 100 000 g during 30 minutes after assembling. The concentration of alpha-synuclein in the supernatant was then measured and subtracted from initial concentration to obtain the final concentration of alpha-synuclein in the assemblies. Alpha-synuclein strains were then fragmented by sonication during 20 minutes (250W, 2.4 kHz).

Transmission electron microscopy and limited proteolysis

Polymorphs characterization were established using electron microscopy (datas not show) and limited proteolysis as previously described (*Landureau et al., 2021*).

Pure astrocytes and neurons primary culture

Rat primary neuronal of astrocyte cultures were performed following previously described protocol (*Shrivastava et al., 2013*). Slightly modified as indicated below. Dissociated cortex were plated with a density of 2×10^6 cells for neurons or 3×10^6 cells for astrocytes in a 6 cm plates precoated with poly-D, L-ornithine in attachment media. For neurons, the attachment medium was replaced after 3 hours by astrocyte-conditioned medium to prevent any growth of astrocytes. 1/3 of the neurons medium was changed at DIV4 and DIV6 with brain phys supplemented with SM1 (*Bardy et al., 2015*). The astrocyte medium was replaced every 3 days by a mix of neuronal medium supplemented with B27 and brain phys medium supplemented with SM1 in order to have a medium similar to the one used for neurons. To control cellular morphologies, neurons and astrocytes were incubated in hoechst (1/5000) during 30 minutes and washed 3 times with Dulbecco's modified Eagle's Medium without red phenol. 0.1% of trypan blue was added and cells were imaged on an Axio Observer ZI epifluorescence microscope (Zeiss) at a magnification of 20x.

Astrocytes and neurons exposure to alpha-synuclein

At DIV13, 1uM of monomers or alpha-synuclein strains (fibrils, ribbons, fibrils 91) was added to neurons and astrocytes medium during 2 hours. After 2 hours, the medium was changed and astrocytes and neurons lysates were recovered in 2x500uL of PBS

(Phosphate Buffer Saline) immediately, after 24 hours or after 48 hours: and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Western-blot

For western blotting, 100uL of cells were lysed in 100uL of RIPA buffer 2x (Tris pH 7.5, 100mM, NaCl 100mM, EDTA 4mM, Na-Deoxycholate 1mM, Triton x100 2%, SDS 0.2%) on ice during 1 hour. Protein concentration in the lysate was then determined by BCA. Samples were dried in Speed Vacum and solubilized by incubation during 1 hours in HFIP (Hexafluoropropan-2-ol). HFIP was removed by evaporation. Samples were then resuspended and adjusted at 1ug/uL of protein in Laemmli buffer 1x. 20ug of proteins per well were then migrated on Tris-Glycine SDS-PAGE (15%) gel electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane following a standard method. All the sample (lysate from cells exposed to the same alpha-synuclein form: monomers, fibrils, ribbons or fibrils 91, n=3, and recovered after different time point: 2h, 24h and 48h) have been migrated and transferred to the same gel/membrane. Membranes were blocked with 5% milk and incubated with the antibodies 4B12 (ThermoFisher), Syn1 (BD), ASYM (Agrisera), 10D2 (Analytic Jena), anti-GFAP (ABCAM), or anti-tubuline (ABCAM) overnight. Membranes were washed and incubated for 1 hour at room temperature with a secondary HRP antibody goat anti-mouse IgG (GeneTex) or goat anti-chicken (ThermoFisher) for GFAP and revealed with a chemidoc imager (biorad).

Statistical analyses

All the experiments have been performed on 3 different cultures. Graphs and statistical analyses of alpha-synuclein degradation have been done using the software Prism GraphPad. Graphs and statistical analyses of alpha-synuclein internalization have been done using the software KaleidaGraph 4.5. Because of the number of replicats, we used Kruskal-Wallis test; the cut-off statistical significance was defined by a *p value* < 0.05.

Fluorescent microscopy

Alpha-synuclein labelling were done as previously described (*Schriavastava et al., 2020*). Primary cultures were exposed for 2 hours to 1uM of alpha-synuclein-ATTO488 (monomers, fibrils, ribbons or fibrils 91). Cells were then washed with DMEM and incubated 30 minutes with Hoesch in DMEM (1/5000) to label the nucleus of cells. Cells were washed with DMEM, incubated with trypan blue 0.1% to quenched extra-cellular fluorescent and analyzed by microscopy.

REFERENCES

- Ahn K. J., Paik S.R., Chung K. C., Kim J., *Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein*, *J. Neurochem.*, 97(1):265-79, (2006).
- Bardy C., Van Den Hurk M., Eames T., Marchand C., Hernandez R.V., Kellogg M., Gorris M., Galet B., Palomares V., Brown J., Bang A.G., Mertens J., Böhnke L., Boyer L., Simon S., Gage F.H., *Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 19;112(20):E2725-34, (2015).
- Beach T.G., Adler C.H., Lue L., Sue L.I., Bachalakuri J., Henry-Watson J., Sasses J., Boyer S., Shirohi S., Brooks R., Eschbacher J., White 3rd C.L., Caviness J., Shill H.A., Connor D.J., Sabbagh M.N., Walker D.G., *Arizona Parkinson's Disease Consortium, Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction*, *Acta Neuropathol.*, 117(6):613-34, (2009).
- Bousset L., Pieri L., Ruiz-Arlandis G., Gath J., Henning Jensen P., Habenstein B., Madiona K., Olieric V., Böckmann A., Meier B. H., Melki R., (2013), *Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains*, *Nature communications*, 4:2575.
- Braak H., Del Tredici K., Rüb U., De Vos R.A.I., Jansen Steur E.N.H., Braak E., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*, *Neurobiology of Aging*, 24, 197-211, (2003).
- Braak H., Ghebremedhin E., Rüb U., Bratzke H., Del Tredici K., *Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology*, *Cell Tissues Res.*, 318(1):121-34,(2004)
- Dehay B., Bourdenx M., Gorry P., Przedborski S., Vila M., Hunot S., Singleton A., Olanow C.W., Beard E., Petsko G.A., Meissner W.G., *Targeting a-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations*, *Lancet Neurol.* 14(8):855-866, (2015).
- Filippini A., Mutti V., Faustini G., Longhena F., Ramazzina I., Rizzi F., Kaganovich A., Roosen D.A., Landeck N., Duffy M., Tessari I., Bono F., Fiorentini C., Greggio E., Bubacco L., Bellucci A., Missale M., Cookson M.R., Gennarelli M., Russo I., *Extracellular clusterin limits the uptake of a-synuclein fibrils by murine and human astrocytes*, *Glia*, 12;JN-RM-0954-20, (2020)
- Gath J., Bousset L., Habenstein B., Melki R., Böckmann A., Meier BH. *Unlike twins: an NMR comparison of two a-synuclein polymorphs featuring different toxicity*, *PLoS One*, 5; 9(3):e90659, (2014).

- Gath J., Habenstein B., Bousset L., Melki R., Meier BH., Böckmann A. Solid-state NMR sequential assignments of α -synuclein, *Biomolecular NMR Assignments*, 6(1) :51-55, (2012).
- Goedert, M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 492–501 (2001)
- Goedert M., Jakes R., Spillantini M.G., The synucleinopathies: twenty years on, *J Parkinson Dis.*, S51-S69, (2017).
- Guerrero-Ferreira R., Taylor N.M., Arteni A.A., Kumari P., Mona D., Ringler P., Britschgi M., Lauer M.E., Makky A., Verasdonck J., Riek R., Melki R., Meier B. H., Böckmann A., Bousset L., Stahlberg H., Two new polymorphic structures of human full-length alpha-synuclein fibrils solved by cry-electron microscopy, *Elife*, e48907, (2019).
- Gustot A., Gallea J.I., Sarroukh R., Celej M.S., Ruysschaert J.M., Raussens V., Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in Parkinson's disease, *1;471(3):323-33*, (2015).
- Kantarci K., Avula R., Senjem M.L., Samikoglu A.R., Zhang B., Weigand S.D., Przybelski S.A., Edmonson H.A., Vemuri P., Knopman D.S., Ferman T.J., Boeve B.F., Petersen R.C., Jack Jr C.R., Dementia with Lewy bodies in Alzheimer disease: neurodegenerative patterns characterized by DTI, *Neurology*, 1;74(22):1814-21, (2010).
- Lee H.J., Suk J.E., Bae E.J., Lee J.H., Paik S.R., Lee S.J., Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular α -synuclein, *Int J Biochem Cell Biol.*, 40(9) :1835-49, (2008).
- Lee H.J., Suk J.E., Bae E.J., Lee S.J., Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia, *J Neurosci.* 1;372(3):423-8, (2008)
- Loria F., Vargas J.Y., Bousset L., Syan S., Salles A., Melki R., Zurzolo C., α -synuclein transfer between neurons and astrocytes indicates that astrocytes play a role in degradation rather than in spreading, *Acta Neuropathol*, 134:789-808, (2017).
- Melki R., How the shapes of seeds can influence pathology, *Neurobiology of disease*, 109:201-208, (2018).
- Peelaerts W., Baekelandt V., α -Synuclein strains and the variable pathologies of synucleinopathies, *J Neurochem.*, 139 Suppl 1:256-274, (2016).
- Peelaerts W., Bousset L. Van der Perren a., Moskalyuk A., Pulizzi M., Van den Haute C., Melki R., Baekelandt V., α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration, *Nature*, V522, 340:344 , (2015).
- Peng C., Gathagan R.J., Covell D.J., Medellin C., Streber A., Robinson J.L., Zhang B., Pitkin R.M., Olufemi M.F., Luk K.C., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y., Cellular milieu

imparts distinct pathological α -synuclein strains in α -synucleinopathies, (2018), *Nature*, Vol.552, Issue 7706, p558-563.

- Rey N. L., Bousset L., George S., Madan Z., Meyerdirk L., Schulz E., Steiner J. A., Melki R., Brundin P., *α -Synuclein conformational strains spread, seed and target neuronal cells differentially after injection into the olfactory bulb.*, (2019), *Acta Neuropathol Commun.*, 30:7(1):221.
- Shrivastava A. N., Bousset L., Renner M., Redeker V., Savistchenko J., Triller A., Melki R., *Differential membrane binding and seeding of distinct α -synuclein fibrillar polymorphs*, *Biophys J.*, 118, 1-20, (2020).
- Shrivastava A. N., Kowalewski J.M., Renner M., Bousset L., Koulakoff A., Melki R., Giaume C., Triller A., *B-amyloid and ATP-induced diffusional trapping of astrocyte and neuronal metabotropic glutamate type-5 receptors*, *Glia*, 61(10) :1673-86, (2013).
- Sidoryk-Wegrzynowicz M., Struzynska L., *Dysfunctional glia: contributors to neurodegenerative disorders*, *Neural Regen Res.*, 16(2):218-222, (2021).
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. *α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 6469–6473 (1998).
- Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Cairns N.J., Lantos P.L., Goedert M., *Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies*, *Neuroscience Letters* 251, 205-208, (1998).
- Strohäker T., Jung B.C., Liou S.H., Fernandez C.O., Riedel D., Becker S., Halliday G.M., Bennati M., Kim W.S., Lee S.J., Zwecksteter M., *Structural heterogeneity of α -synuclein fibrils amplified from patient brain extracts*, *Nat. com.*, 10:535., (2019).
- Tsunemi T., Ishiguro Y., Yoroisaka A., Valdez C., Miyamoto K., Ishikawa K., Saiki S., Akamatsu W., Hattori N., Krainc D., *Astrocytes protect human dopaminergic neurons from α -synuclein accumulation and propagation*, *J. Neurosci.*, 12;JN-RM-0954-20, (2020).
- Van der Perren A., Gelders G., Fenyi A., Bousset L., Brito F., Peelaerts W., Van den Haute C., Gentleman S., Melki R., Baekelandt V., *The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies*, *Acta Neuropathol.*, (2020).

SUPPORTING INFORMATION

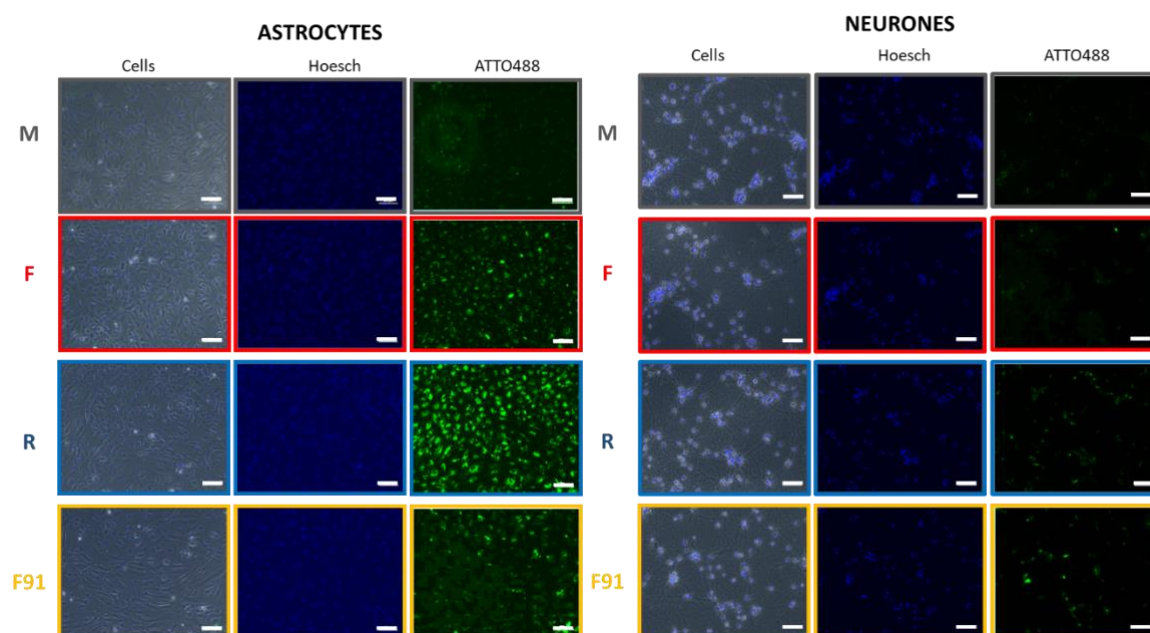


Figure S1: Alpha-synuclein internalization

Observation, by fluorescent microscopy, of alpha-synuclein monomers or strains labelling with ATTO488 internalization by astrocytes and neurons. Images correspond, from left to right, to the direct visualization of cells, to the Hoesch labelling (cells' nucleus) and to the ATTO488 labelling (alpha-synuclein). Scale bar = 100um.

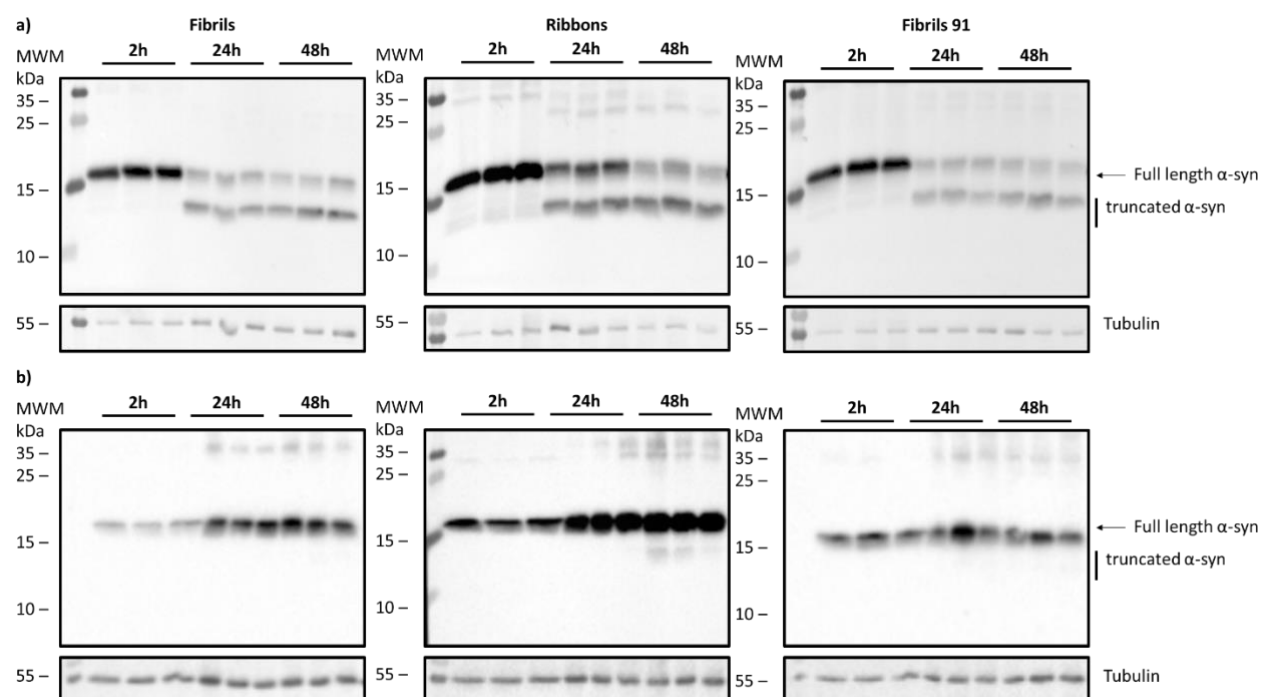


Figure S2: Alpha-synuclein degradation

Western blot using the antibody anti alpha-synuclein (4B12) of neurons (a) or astrocytes (b) lysates exposed to 1uM of monomeric alpha-synuclein or fibrils, ribbons or fibrils 91 during 2h after 0h, 24h or 48h of processing, n=3 replicates.

CHAPITRE 4 : CONCLUSION ET DISCUSSION

1. Etude de la surface de souches d'alpha-synucléine *in vitro*

Le premier objectif de cette thèse était de caractériser la surface de différentes souches d'alpha-synucléine générées *in vitro*, les fibres, les rubans et les fibres 91. Notons qu'il a été montré que deux de ces souches, les rubans et les fibres, présentent un repliement proche de celui d'agrégats amplifiés de patients atteints de la maladie de Parkinson ou d'AMS (pour les rubans), ou encore de DLB (pour les fibres) (*Van Der Perren et al., 2019*). Les méthodes structurales classiques telles que la RMN ou la cryo-microscopie par exemple permettent de caractériser les régions hautement structurées des protéines mais ne rendent pas possible l'identification des régions de surface. Nous avons donc mis en place au cours de ce travail différentes méthodologies afin d'étudier spécifiquement la surface des agrégats polymorphes d'alpha-synucléine.

La première approche que nous avons utilisée est la technique de protéolyse ménagée associée à l'identification des peptides générés par immuno-détection et spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF. Nous avons testé différentes enzymes afin d'en choisir deux, la protéinase K et la thermolysine. Ces protéases présentent l'avantage de pouvoir cliver l'alpha-synucléine tout au long de sa séquence et génèrent des profils protéolytiques souche-spécifiques et enzyme-spécifiques hautement reproductibles. L'utilisation de l'immuno-détection par western blot puis de la spectrométrie de masse MALDI-TOF nous a permis d'identifier les peptides générés par protéolyses ménagées. Nous avons ainsi mis en évidence une région fortement accessible pour les trois souches d'alpha-synucléine ; l'extrémité C-terminale de la protéine, à partir de la glycine 111. Nous avons également démontré des différences d'accessibilité entre les souches au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine. En effet, alors que les rubans sont totalement inaccessibles sur cette région, les fibres présentent une accessibilité assez étendue, jusqu'à l'alanine 30 et les fibres 91 montrent une accessibilité plus restreinte, jusqu'à l'alanine 19. De manière étonnante, plusieurs extrémités C-terminales tronquées (ou « complémentaires ») des peptides identifiés sont retrouvés intacts dans nos échantillons. Ce résultat indique que les protéases n'ont pas dégradé progressivement l'extrémité C-terminale des agrégats mais les ont clivés au niveau de sites spécifiques suggérant une certaine organisation de cette extrémité. Cette rigidité de l'extrémité C-terminale a déjà été observé au

niveau de monomères d'alpha-synucléine, après leur liaison via l'extrémité N-terminale de la protéine à des micelles de SDS (*Polverino de Laureto et al., 2006*) mais reste un phénomène très peu décrit. L'exploration des conséquences fonctionelles de cette rigidité pourrait apporter des éléments important à la compréhension de l'agrégation de l'alpha-synucléine.

Dans le but de confirmer et d'affiner nos résultats, nous avons employé une seconde méthode pour l'étude de la surface de ces souches ; les échanges hydrogène-deutérium. Bien que difficile à mettre en place, cette technique présente l'avantage de permettre l'étude précise de la surface de nos agrégats et nous permet de définir l'accessibilité des souches avec une résolution plus importante que les protéolyses ménagées. Cette expérience confirme les résultats précédemment obtenus mais montre également une accessibilité de nos souches un peu plus étendue. En effet, par cette technique, nous observons une accessibilité de la région C-terminale de nos souches à partir de l'acide aminé 94. L'accessibilité de la région N-terminale s'étend jusqu'à l'acide aminé 38 pour les fibres et seulement jusqu'à l'acide aminé 17 pour les fibres 91. Les rubans restent inaccessibles au niveau de la région N-terminale. Ce résultat est cohérent avec les limitations de la méthodologie des protéolyses ménagées. En effet, dans les expériences de protéolyses ménagées, pour cliver l'alpha-synucléine, les protases doivent être dans une région accessible et avoir suffisamment de place (environ 10 acides-aminés) pour se fixer à la protéine. Il apparait donc logique que les échanges hydrogène-deutérium soient plus résolutifs à l'échelle de la séquence en acides aminés et révèlent des régions accessibles un peu plus étendues.

Enfin, dans le but de vérifier si ces différences de surface sont suffisantes pour permettre de discriminer facilement les souches d'alpha-synucléine, nous avons effectué des expériences d'immuno-marquage des souches non-dénaturées par dot blot. Nous avons exposé des monomères d'alpha-synucléine et les trois souches non dénaturées à des anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement les extrémités N-terminales, C-terminales ou la région centrale de l'alpha-synucléine. Les anticorps ont ainsi marqué de manière différentielle chacune des formes de l'alpha-synucléine ; l'anticorps ciblant la région N-terminale n'a marqué que très faiblement les rubans, l'anticorps ciblant le NAC n'a marqué intensément que les monomères, et l'anticorps ciblant la région C-terminale a marqué de manière importante l'ensemble des formes de l'alpha-synucléine, avec un marquage plus important pour les trois souches par rapport aux monomères. Cette expérience montre qu'il est possible de discriminer

différentes formes d'alpha-synucléine, en particulier les monomères des formes agrégées et les rubans des fibres, en utilisant des anticorps. Ce type de méthodologie pourrait être appliquée dans une perspective de diagnostic.

Les résultats obtenus concernant la surface des agrégats se complètent mutuellement et sont en accord avec les données de RMN et de cryo-microscopie précédemment publiées. Ils ouvrent la porte à de potentielles perspectives diagnostics ou thérapeutiques. En effet, la connaissance de la surface des souches impliquées dans les synucléinopathies peut permettre de développer des molécules capables de cibler spécifiquement ces surfaces dans le but de (1) discriminer la souche d'alpha-synucléine présente chez un patient ou (2) modifier ces surfaces pour empêcher la liaison des agrégats à leurs partenaires protéiques ou lipidiques et ainsi limiter leur toxicité et/ ou leur propagation.

2. Etude de la surface des souches *in cellulo*

Le second objectif de cette thèse était de déterminer si l'accessibilité de la surface des différentes souches étudiées persiste dans un contexte cellulaire. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la dégradation de ces souches par des cultures primaires de neurones et d'astrocytes afin d'observer si les surfaces accessibles aux protéases *in vivo* l'étaient toujours *in cellulo* à la manière d'une « protéolyse ménagée cellulaire ». Nous avons donc exposé des cultures de neurones et d'astrocytes aux trois souches d'alpha-synucléine pendant 2 heures et nous avons ensuite observé par immuno-détection la cinétique de diminution de l'alpha-synucléine intra-cellulaire ainsi que l'apparition de formes tronquées d'alpha-synucléine dans les cellules après 24 heures ou 48 heures de prise en charge.

Nous avons montré que les trois souches d'alpha-synucléine sont dégradées par les astrocytes. En revanche, on ne retrouve que très peu voire pas de dégradation des souches d'alpha-synucléine par les neurones après 48 heure de prise en charge. Nous avons ensuite identifié les formes tronquées de l'alpha-synucléine générées par les astrocytes par immuno-détection. Ces formes correspondent à des troncatures de l'extrémité C-terminale de l'alpha-synucléine pour chacune des souches. Cette observation soutient le fait que la région C-terminale, exposée à la surface des trois

souches *in vitro*, reste une région accessible dans les cellules. En revanche, nous n'avons pas pu observer de formes tronquées de l'extrémité N-terminale dans nos cellules. Ce résultat suggère que cette extrémité n'est soit, plus accessible *in cellulo* (car elle serait par exemple liée à d'autres protéines ou partenaires cellulaires) soit, que les protéases cellulaires ne sont pas capables de la dégrader. Il est également possible que des formes tronquées en N-terminal de l'alpha-synucléine aient été générées par les cellules mais dans des proportions trop faibles pour être détectées par immunomarquage. Une analyse plus fine des échantillons par électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse pourrait permettre de mettre en évidence des formes tronquées en N-terminale de l'alpha-synucléine si elles sont effectivement présente en faible quantité (Pieri et al., 2016).

3. Conséquences fonctionnelles des spécificités de surface

Cette thèse est basée sur l'hypothèse selon laquelle l'existence des souches pourrait expliquer la diversité des synucléinopathies. En effet, les fonctions d'une protéine sont largement liées à sa structure. Les trois souches étudiées ici présentent des surfaces distinctes et donc potentiellement des affinités de liaison à des partenaires protéiques ou lipidiques différentes. Nous nous sommes donc intéressés aux différences fonctionnelles, en termes de dégradation et d'internalisation, résultantes des différences de surface de ces souches d'alpha-synucléine.

Nous avons observé que les différents polymorphes d'alpha-synucléine ne sont pas dégradés avec la même efficacité par les cellules. En effet, les fibres 91 sont dégradées de manière significativement plus importante que les autres souches par les astrocytes après 24 heures de prise en charge. Également, ces mêmes fibres 91 sont dégradées par les neurones après 48 heures de prise en charge alors que l'on n'observe pas de diminution de la quantité d'alpha-synucléine intracellulaire dans les neurones exposés aux fibres ou aux rubans après 48 heures. L'efficacité des protéases cellulaires est en partie liée à l'accessibilité à leurs substrats. Les protéases cellulaires apparaissent moins aptes à dégrader certaines structures d'alpha-synucléine, potentiellement à cause d'une difficulté à se lier à celles-ci, entraînant donc une persistante d'agrégats dans la cellule. Il apparaît donc que ce sont bien les différences de surface des souches d'alpha-synucléine qui entraînent des différences en termes de résistance à la dégradation.

Afin de compléter cette étude fonctionnelle, nous avons étudié l'internalisation des différentes souches par les neurones et les astrocytes. Cette étude est particulièrement intéressante pour différentes raisons. La première est qu'il a été montré que la région N-terminale de l'alpha-synucléine est impliquée dans son internalisation par des cultures cellulaires (*Ahn et al., 2006*). Puisque nous avons mis en évidence des différences de surface au niveau de cette région, celles-ci pourraient entraîner des différences en termes d'internalisation. Un autre point important est que l'internalisation des différentes souches par les neurones et les astrocytes est un élément fondamental dans le développement des synucléinopathies. En effet, l'internalisation des agrégats d'alpha-synucléine par les neurones va permettre leur propagation dans différentes régions cérébrales au cours du temps. Des souches plus facilement internalisées par les neurones seront donc potentiellement plus promptes à se propager. Cependant, notre équipe et d'autres (*Tsunemi et al., 2020, Filippini et al., 2020, Loria et al., 2017*) ont également montré que les astrocytes sont impliqués dans la dégradation des agrégats d'alpha-synucléine. Si certaines souches sont plus aptes à être internalisées par les astrocytes, elles seront également dégradées de manière plus importante et se propageront moins dans le cerveau au cours du temps.

Les résultats montrent que les rubans sont significativement mieux internalisés que les autres souches, à la fois par les astrocytes et par les neurones. Puisque, comme nous l'avons expliqué, l'extrémité N-terminale de l'alpha-synucléine est impliquée dans l'internalisation de l'alpha-synucléine par les cellules, il est donc logique que les rubans, qui se démarquent le plus en termes d'accessibilité de leur région N-terminale, se démarquent également au niveau fonctionnel. Un autre argument est que les fibres 91, qui présentent une accessibilité de leur extrémité N-terminale *in vitro* moins étendue que les fibres, sont également plus facilement internalisées par les neurones et les astrocytes que les fibres. Les résultats tendent donc à montrer que l'inaccessibilité de la région N-terminale des souches entraîne une facilitation de leur internalisation par les astrocytes et les neurones. Nous aurions pu cependant nous attendre à un résultat inverse. Une hypothèse est que cette facilitation s'effectue de manière indirecte. Une récente étude démontre que les agrégats d'alpha-synucléine sont internalisés par les astrocytes via un mécanisme d'endocytose dépendant de leur liaison à la dynamine membranaire (*Filippini et al., 2020*). Cette même étude démontre également que les agrégats exogènes peuvent se lier à une protéine, la clusterine, entraînant un masquage du site de reconnaissance aux récepteurs membranaires et inhibant ainsi leur internalisation. Il est donc envisageable que les souches d'alpha-synucléine

accessibles au niveau de leurs régions N-terminales (les fibres et dans une moindre mesure les fibres 91) se lient préférentiellement à la clusterine, inhibant alors leur internalisation.

Concernant les conséquences fonctionnelles sur la propagation des souches dans le cerveau, un double effet s'applique. Puisque les rubans sont plus facilement internalisés par les neurones, ils devraient se propager de manière plus efficace dans le cerveau. Cependant, puisque ces mêmes rubans sont également internalisés plus facilement par les astrocytes, ils devraient être dégradés de manière plus importante. En effet, lorsque ces trois souches sont injectées dans le bulbe olfactif de souris, ce sont les souris auxquelles des rubans ont été injectées qui présentent le plus d'inclusions d'alpha-synucléine marquées par la phospho-sérine 129 après 3 mois. En revanche, ce sont les souris auxquelles des fibres 91 ont été injectées qui présentent la propagation d'agrégats d'alpha-synucléine la plus étendue 6 mois post-injection (*Rey et al., 2019*), résultant probablement de la combinaison de ces deux effets antagonistes (propagation versus dégradation).

4. Perspectives

Perspectives méthodologiques

Durant cette thèse, nous avons mis en place des méthodologies permettant l'étude de la surface d'agrégats d'alpha-synucléine. Les difficultés d'étude liées à la faible structuration de ces surfaces, contrairement au squelette des agrégats, qui empêche une analyse par des méthodes de biologie structurale « traditionnelles » et les contraintes dues à la nature fibrillaire et insoluble de nos assemblages ont pu être surmontées. Les stratégies que nous avons mises en place pour étudier ce type d'agrégat pourront être généralisées à l'analyse de la surface d'autres assemblages de type amyloïde (Tau, peptide bêta-amyloïde, huntingtine, PrPsc etc.). Quelques études ont d'ailleurs déjà utilisé ce type de stratégie, soit les protéolyses ménagées soit les HDX, afin de décrire la surface ou les mécanismes d'agrégation de certains assemblages protéiques (*Von Bergen et al., 2006, Illes-Toth et al., 2019*). L'association de ces deux méthodologies pour la description de la surface d'agrégats apparaît une stratégie efficace.

Application à des échantillons humains

Nous avons réussi à décrire des surfaces accessibles de différentes souches d'alpha-synucléine générées *in vitro*. Une étude récente (*Van der Perren et al., 2020*) tend à prouver que les fibres et les rubans étudiés dans cette thèse présentent un repliement proche de celui des agrégats retrouvés chez les patients atteints respectivement (1) de démences à corps de Lewy ou (2) de la maladie de Parkinson ou d'AMS. Il paraît maintenant primordial de confirmer que les surfaces accessibles des souches étudiées *in vitro* correspondent aux surfaces des agrégats issus de patients. Les stratégies appliquées *in vitro* dans cette thèse peuvent être adaptées à des échantillons humains. Cependant, la quantité de matériel nécessaire implique d'effectuer une amplification des agrégats par PMCA (protein misfolding amplification) (*Fenyi, 2019*) entraînant potentiellement des biais. Le biais majeur étant que cette technique permette l'amplification d'une souche unique alors que plusieurs souches pourraient co-exister chez un même patient.

Perspectives diagnostics

Si effectivement la surface des souches étudiées ici correspond à la surface de souches retrouvées chez des patients, des applications diagnostics seront alors envisageables. En effet, les spécificités de surface mises en évidence au niveau de la région N-terminale pourraient être utilisées afin de diagnostiquer précocement et de stratifier précisément les patients atteints de différentes synucléinopathies. Plusieurs études démontrent que des agrégats d'alpha-synucléine apparaissent au niveau du système périphérique autonome du patient (tube digestif, glandes salivaires) bien avant leur apparition dans le système nerveux central (*Couloume et al., 2018, Fenyi et al., 2019*). Des biopsies pourraient donc être réalisées sur des patients présentant des facteurs de risque ou les premiers symptômes évocateurs d'une maladie neurodégénérative. Si ces patients présentent des agrégats d'alpha-synucléine au niveau de ces régions, l'évaluation de l'accessibilité de la région N-terminale de l'alpha-synucléine au sein de ces agrégats, par immuno-détection par exemple, pourrait permettre d'affiner le diagnostic. Il est envisageable de développer des anticorps spécifiques ou de se servir des anticorps déjà existant utilisés dans cette thèse (ASym 1-15, Syn1 91-99, 10D2 118-127) pour cibler les régions différemment accessibles des souches d'alpha-synucléine (extrémité N-terminale de la protéine), les régions accessibles de manière égale des souches (extrémité C-terminale de l'alpha-synucléine) et les régions protégées (région NAC) afin de détecter chez des patients des ratios de marquage NAC-aSyn/ C-term-aSyn et N-term-aSyn/ C-term-aSyn. Le premier ratio pourrait permettre de déterminer

la proportion d'alpha-synucléine peu accessible au niveau de sa région NAC (alpha-synucléine non-monomérique) sur la quantité totale d'alpha-synucléine (accessible au niveau de son extrémité C-terminale) c'est-à-dire la proportion d'alpha-synucléine agrégée. Si une quantité d'alpha-synucléine agrégée importante est détectée (ratio $<<1$), le second ratio permettrait de déterminer la quantité d'alpha-synucléine accessible au niveau de son extrémité N-terminale par rapport à l'alpha-synucléine accessible au niveau de son extrémité C-terminale. Cette seconde accessibilité permettrait de stratifier les patients selon deux types de souches « fibre-like » ou « rubans-like ». Rappelons que même s'il n'existe pas encore de traitement curatif contre ces maladies, le diagnostic précoce est essentiel à une stratification des patients pour une meilleure prise en charge et peut également permettre de tester des médicaments potentiels avant d'atteindre une dégénérescence trop avancée.

Perspectives thérapeutiques

Notre étude ouvre également la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, puisque la région C-terminale des souches d'alpha-synucléine est extrêmement accessible, à la fois *in vitro* et dans un contexte cellulaire, elle pourrait servir de cible thérapeutique. Le développement de molécules, comme des anticorps, capables de cibler spécifiquement cette région représente une stratégie d'intérêt. Nous avons également montré que les agrégats d'alpha-synucléine pouvaient être tronqués au niveau des acides aminés à proximité du résidu 120 de la région C-terminale (reconnaissance des formes tronquées par l'anticorps Syn1 mais pas par l'anticorps 10D2). De plus, les résultats des échanges hydrogène-deutérium ont permis de déterminer que l'accessibilité de cette région s'étend jusqu'à l'acide aminé 94. Ainsi, il serait intéressant de développer des molécules ciblant le début de l'extrémité C-terminale, au niveau des acides aminés 95 à 110 par exemple. En effet, ces molécules cibleraient alors une région accessible mais peu tronquée permettant ainsi de neutraliser le maximum d'agrégats présents. La liaison de molécules à la région 95-110 environ des agrégats d'alpha-synucléine pourrait permettre de modifier leurs affinités pour les protéines environnantes en modifiant leurs surfaces accessibles dans le but de diminuer leur propagation et de promouvoir leur dégradation (*Bergström et al., 2016*). Notons qu'un anticorps ciblant la région 118 à 127 de l'extrémité C-terminale de l'alpha-synucléine est actuellement en phase d'essai clinique et semble montrer des effets prometteurs (pas d'effets secondaires importants, diminution de la quantité d'alpha-synucléine libre dans le sérum des patients) chez des patients atteints de la

maladie de Parkinson (*Jankovic et al., 2018*). Les résultats de la phase clinique 2 sont attendus pour juin 2021.

Rôle des astrocytes

Ce travail démontre également que les astrocytes ont une capacité importante à dégrader les agrégats d'alpha-synucléine. Il semblerait que les astrocytes sont également capables de dégrader d'autres types d'assemblage, notamment les agrégats extracellulaires du peptide bêta amyloïde caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (*Wyss-Coray et al., 2003*).

Plusieurs études attribuent un rôle neurotoxique aux astrocytes dans un contexte de synucléinopathies. En effet, en conditions pathologiques, certains astrocytes deviennent « réactifs » et sont alors caractérisés par une hypertrophie et une surexpression de la protéine GFAP. Ces astrocytes participent alors au phénomène de neuro-inflammation en relarguant des molécules pro-inflammatoires (*Niranjan, 2013*). Parallèlement, d'autres études attribuent un rôle protecteur des astrocytes dans un contexte de synucléinopathies via le relargage de molécules neuroprotectrices. Il a été proposé de résoudre cette ambivalence en classifiant les astrocytes selon deux types : les astrocytes A1 délétères et les astrocytes A2 protecteurs. La « conversion » en astrocytes A1 pourrait être induite par la microglie réactive environnante (*Liddelow et al., 2017*). Notre étude soutient également un rôle protecteur des astrocytes, via leur implication dans la dégradation des agrégats pathologiques, qui laisse imaginer de potentielles applications thérapeutiques, une piste très intéressante bien que peu explorée jusqu'à présent (*Tsunemi et al., 2020*). Une étude plus précise des mécanismes impliqués dans cette dégradation semble nécessaire mais le développement de traitements « astro-protecteurs » et la stimulation des astrocytes de type « A2 » pourrait se révéler plus aisé que celui de neuroprotecteurs aux vues de la capacité de division de ces cellules.

Hypothèse des souches

Enfin, cette thèse ouvre des perspectives plus fondamentales concernant les mécanismes impliqués dans le développement des synucléinopathies. En effet, notre étude *in cellulo* met en évidence des caractéristiques propres à chacune des souches d'alpha-synucléine étudiées, liées à leurs spécificités de surface. Les résultats que nous avons obtenus soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'existence des souches pourrait expliquer l'hétérogénéité des synucléinopathies. Des études complémentaires sont maintenant nécessaires afin de déterminer, par exemple, l'interactome spécifique de

chacune des souches d'alpha-synucléine ainsi que les mécanismes précis impliqués dans la formation et la propagation de ces polymorphes *in vivo*.

En conclusion, cette thèse nous a permis d'ouvrir différentes pistes, tant pour la compréhension des mécanismes impliquées dans les synucléinopathies que pour le développement d'outils diagnostics et thérapeutiques. Cette étude, ainsi que l'ensemble des travaux actuels s'intéressant aux maladies neuro-dégénératives, laissent entrevoir de l'espoir pour la compréhension et pour la guérison de ces pathologies.

REFERENCES

A

- Abounit S., Gousset L., Loria F., Zhu S., De Chaumont F., Pieri L., Olivo-Marin J.C., Melki R., Zurzolo C., Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes, (2016) *EMBO*, 4;35(19):2120-2138.
- Ahn K.J., Paik S.R., Chung K.C., Kim J., Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of α -synuclein, (2006), *J. Neurochem*, 97(1):265-79.
- Alam P., Bousset L., Melki R., Otzen D.E., α -synuclein and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities, (2019), *J Neurochem*, 150(5):522-534
- Anderson J.P., Walker D.E., Goldstein J.M., De Laat R., Banducci K., Caccavello R.J., Bardour 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., Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α -synuclein in familial and sporadic lewy body disease, (2006), *J Biol Chem*, 6;281(40):29739-52.

B

- Baba M., Navajo S., Tu P.H., Lomita T., Nakaya K., Lee V.M., Trjanowski J.Q., Iwatsubo T., Aggregation of α -synuclein in lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, (1998), *Am J Pathol.*, 152(4):879-84.
- Bacardi S., Rossi M., Capellerai S., Parchi P., Recent advances in the histomolecular pathology of human prion disease, (2019), *Brain Pathology*, 29, 278-300.
- Bai Y., Milne J.S., Mayne L., Englander S.W., Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange, (1993), *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 17:75-86.
- Bardy C., Van Den Hurk M., Eames T., Marchand C., Hernandez R.V., Kellogg M., Gorris M., Galet B., Palomares V., Brown J., Bang A.G., Mertens J., Böhnke L., Boyer L., Simon S., Gage F.H., Neuronal medium that supports basis synaptic functions and activity of human neurons *in vitro*, (2015), *Proc Natl Acad Sci USA*, 19;112(20):E2725-34.

- Bartels T., Ahlstrom L. S., Leftin A., Kamp F., Haass C., Brown M., Beyer K., The N-terminus of the intrinsically disordered protein α -synuclein triggers membrane binding and helix folding, (2010), *Biophysical Journal*, V99, I7, 2116-2124.
- Bartels T., Choi J.G., Selkoe D.J., α -synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation, (2011), *Nature*, 14;477(7362):107-10.
- Bastide M. F., Bézard E., L-Dopa induced dyskinesia in Parkinson's disease, (2015), *Bull. Acad. Natl. Med.*, 199, No 2-3, 201-212.
- Bennett M.C., Bishop J.F., Chock P.B., Chase T.N., Mouradian M.M., Degradation of α -synuclein by proteasome, (1999), *J Biol Chem*, 26;274(48):33855-8.
- Bergström A.L., Kallunki P., Fog K., Development of passive immunotherapies for synucleinopathies, (2016), *Mov. Disord.*, 31(2):203-13.
- Binolfi A., Rasia R.M., Bertoncini C.W., Ceolin M., Zweckstetter M., Griesinger C., Jovin T.M., Fernandez C.O., Interaction of α -synuclein with divalent metal ions reveals key differences: a link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement, (2006), *American Chemical Society*, 128, 30, 9893-9901.
- Bousset L., Pieri L., Ruiz-Arlandis G., Gath J., Henning Jensen P., Habenstein B., Madiona K., Olieric V., Böckmann A., Meier B. H., Melki R., (2013), Structural and functional characterization of two α -synuclein strains, *Nature communications*, 4:2575.
- Braak H., Del Tredici K., Rüb U., De Vos R.A.I., Jansen Steur E.N.H., Braak E., Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, (2003), *Neurobiology of Aging*, 24, 197-211.
- Brahic M., Gousset L., Bieri G., Melki R., Gitler A.D., Axonal transport and secretion of fibrillar forms of α -synuclein, A β 42 peptide and HTTExon 1, (2016); 131:539-548.
- Brown P., Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease, (2001), *BMJ*, 7;322(7290):841-844.
- Brown P., Brandel J-P., Sato T., Nakamura Y., MacKenzie J., Will R.G., Ladogana A., Pocchiari M., Leschek E.W., Schonberger L.B., Iatrogenic Creutzfeldt-Jacob Disease, Final assessment, (2012), *Emerg Infect Dis.*, 18(6): 901-907.

- Bruce M.E., Scrapies strain variation and mutation, (1993), Br Med Bull, 49(4):822-38.
- Brundin P., Ma J., Kordower J.H., How strong is the evidence that Parkinson's disease is a prion disorder? (2016), Curr Opin Neurol., 29(4):459-466.
- Brundin P., Melki R., Kopito R., Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases, (2010), Nat Rev Mol Cell Biol, 11(4):301-307.
- Brys M., Franning L., Hung S., Ellenbogen A., Penner N., Yang M., Welch M., Koenig E., David E., Fox T., Make S., Alfred J., Goodman I., Pepinsky B., Liu Y., Graham D., Weihofen A., Cedarbaum J.M., Randomized phase I clinical trial of anti- α -synuclein antibody BII054, (2019), Mov Disord. 34(8): 1154-1163.
- Burré J., The synaptic function of α -synuclein, (2015), Journal of Parkinson's Disease, vol.5, no. 4, pp. 699-713.
- Burré J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M.R., Südhof T.C., α -synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*, (2010), Science, 329(5999):1663-1667.

C

- Caroux E., Déterminants structuraux d'agrégats de Tau distincts: vers de nouveaux outils moléculaires pour discriminer les tauopathies, (2019).
- Chang D., Nalls M.A., Hallgrímsdóttir I.B., Hunkapiller J., Van Der Brug M., International Parkinson's Disease Genomic Consortium, 23andMe research Team, Kerchner G.A., Ayalon G., Bingol B., Sheng M., Hinds D., Behrens T.W., Singleton A.B., Bhangale T.R., Graham R.R., A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci, (2017), Nat Genet, 49(10):1511-1516.
- Chen X., Rohan de Silva H.A., Pettenati M.J., Rao N., St. George-Hyslop P., Roses A.D., Xia Y., Horsburgh K., Uéda K., and Saitoh T., The human NACP/ α -Synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis, Brief reports, Vol.26, issue 2, p. 425-427.
- Chen Y., Yue L., Li Z., Ding X., Wang L., Dai X., Fang X., Pan Y., Ding C.F., Investigation of protonated and sodiated leucine-enkephalin by hydrogen-deuterium exchange and theoretical calculations, (2015), Analytical Methods, issues 13.

- Chien P., Weissman J.S., DePace A.H., Emerging principles of conformation-based prion inheritance, (2004), *Annu. Rev. Biochem*, 73:617-56.
- Chung H.K., Ho H.A., Pérez-Acuna D., Lee S.J., Modeling a-synuclein propagation with preformed fibrils injections, (2019), *J Mov Disord* 12(3):139-151.
- Ciechanover A., Intracellular protein degradation : from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting, (2005), *Angew Chem Int Ed Engl.*, 19 ;44(37) :5944-67.
- Cohen F.E. and Prunier S.B., Pathologic conformations of prion proteins, (1998), *Annu Rev Biochem*, 67:793-819.
- Conway K.A., Harper J.D., Lansbury Jr P.T., Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid, (2000) *Biochemistry*, 14;39(10):2552-63.
- Coufalova D., Michalova E., Vojtesek B., Hernychova L., Hydrogen/Deuterium exchange mass spectrometry and its utilization, (2015), *Mil. Med. Sci. Lett.*, vol. 84(4), p. 146-151.
- Couloume L., Leclair-Visonneau L., Derkinderen P., Les agrégats d'alpha-synucléine: un biomarqueur du diagnostic et du pronostic des synucléinopathies ? (2018), *Pratique Neurologique -FMC*, Vol.9, Issue 2, 152-155.
- Courte J., Bousset L., Von Boxberg Y., Villard C., Melki R., Peyrin J.M., The expression level of alpha-synuclein in different neuronal populations is the primary determinant of its prion-like seeding, (2020), *Sci. Rep.*, 17;10(1):4895.
- Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM, Aromatic amino acids and modification of parkinsonism, (1967), *N Engl J Med*; 276:374–379.
- Cullen V., Lindfors M., Ng J., Paetau A., Swinton E., Kolodziej P., Boston H., Saftig P., Wolfe J., Feany M.B., Myllykangas L., Schlossmacher M.G., Tyynelä J., Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity *in vivo*, (2009), 9;2:5.

D

- Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., George J.M., Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes, (1998), 17;(273(16):9443-9.

- De Mattos E/P/, Wentink A., Nussbaum-Krammer C., Hansen C., Bergink S., Melki R., Kampinga H.H., Protein quality control pathways at the crossroad of synucleinopathies, (2020), J Parkinson Dis., 24.
- Dehay B., Bourdenx M., Gorry P., Przedborski S., Vila M., Hunot S., Singleton A., Olanow C.W., Beard E., Petsko G.A., Meissner W.G., Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations, (2015), Lancet Neurol. 14(8):855-866.
- Delmaire C., Lehericy S., Dormont D., Imaging of dementia in clinical routine. Recommendations of SFNR, (2009), Journal of Neuroradiology, Vol. 37, No 2, p122-126.
- Desplats P., Lee H.J., Bae E.J., Patrick C., Rockenstein E., Crews L., Spencer B., Masliah E., Lee S.J., Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein, (2009), Proc Natl Acad Sci U.S.A., 106(31):13010-5.
- Devos D, Moreau C, Devedjian JC, Kluza J, Petrault M, Laloux C, Jonneaux A, Ryckewaert G, Garçon G, Rouaix N, Duhamel A, Jissendi P, Dujardin K, Auger F, Ravasi L, Hopes L, Grolez G, Firdaus W, Sablonnière B, Strubi-Vuillaume I, Zahr N, Destée A, Corvol JC, Pörtl D, Leist M, Rose C, Defebvre L, Marchetti P, Cabantchik ZI, Bordet R, Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease, (2014), Antioxid Redox Signal, 10;21(2):195-210.
- Dexter D.T., Carayon A., Javoy-Agid F., Agid Y., Wells F.R., Daniel S.E., Lees A.J., Jenner P., Marsden C.D., Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metal in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia, (1991), Brain, 114(Pt4):1953-75.
- Doohum Kim T., Choi E., Rhim H., Paik S.R., Yang C-H., α -synuclein has structural and functional similarities to small heat shock proteins, (2004), Biochem Biophys Res Commun., 324:1352-9.

E

- Ebrahimi-Fakhari D., Cantuti-Castelvetri I., Fan Z., Rockenstein E., Masliah E., Hyman B.T., McLean P.J., Unni V.K., Distinct role in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of α -synuclein, (2011), J Neurosci. 12;31(41):14508-20.

- Eliezer D., Kutluay E., Bussel R.Jr, Browne G., Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states, (2001), J Mol Biol., 6;307(4):1061-73.
- Ellis J., Proteins as molecular chaperones, (1987), Nature, 5;328(6129):378-9.
- Emmanouilidou E., Elenis D., Papasilekas T., Stranjalis G., Gerozissis K., Ioannou P.C., Vekrellis K., Assessment of a-synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma, (2011), PLoS One; 6(7):e22225.

F

- Fahn S., The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease, (2008), Vol. 23, Suppl. 3, pp. S497-S508.
- Faucher N., Diagnostic et prise en charge des démences à corps de Lewy, (2005), SAging.
- Fenyi A., Typage moléculaire des maladies neurodégénératives dues à l'agrégation de la protéine alpha-synucléine, (2019).
- Fenyi A., Leclair-Visonneau L., Clairembault T., Coron E., Neunlist M., Melki R., Derkinderen P., Bousset L., Detection of alpha-synuclein aggregates in gastrointestinal biopsies by protein misfiling cyclic amplification, (2019), Neurobiol. Dis., 129:38-43.
- Filippini A., Mutti V., Faustini G., Longhena F., Ramazzina I., Rizzi F., Kaganovich A., Roosen D.A., Landeck N., Duffy M., Tessari I., Bono F., Fiorentini C., Greggio E., Bubacco L., Bellucci A., Missale M., Cookson M.R., Gennarelli M., Russo I., Extracellular clusterin limits the uptake of a-synuclein fibrils by murine and human astrocytes, (2020), Glia, 12;JN-RM-0954-20.
- Fleury V., Vingerhoets F., Horvath J., Pollak P., Burkhard P., Stimulation cérébrale profonde lors de la maladie de Parkinson et autres troubles du mouvement: indications, résultats et complications, (2015), Rev Med Suisse, Vol. 11, 962-967.
- Flavín W.P., Bousset L., Green Z.C., Chu Y., Skarpathiotis S., Chaney M.J., Kordower J.H., Melki R., Campbell E.M., Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins, (2017), Acta Neuropathol., 134(4):629-653.

- Fontana A., Polverino de Laureto P., Spolaore B., Frare E., Picotti P., Zamboni M., Probing protein structure by limited proteolysis, (2004), *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 51 N°2, 299-321.
- Forest E., Rey M., Proteases for hydrogen exchange mass spectrometry, (2016), *Hydrogen exchange mass spectrometry of proteins: Fundamentals, methods, and applications*, Editor: David D. Weis, Chapter 6.
- Freeman D., Cédilles 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., Alpha-synuclein induces lysosomal rupture and cathepsin dependent reactive oxygen species following endocytosis, (2013), *PLoS One*, 25;8(4):e62143.
- Freund E.C., Maynard N., Clancy E.K., Roy S., Gousset L., Sourigues Y., Covert M., Melki R., Kirkegaard K., Brahic M., Neuron-to-neuron transmission of a-synuclein fibrils through axonal transport, (2012), *Ann Neurol*, 72(4):517-24.
- Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N., Kawashima A., Masliah E., Goldberg M.S., Shen J., Takio K., Iwatsubo T., alpha-synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions, (2002), *Nat Cell Biol*, 4(2):160-4.

G

- Gallardo J., Escalona-Noguero C., and Sot Begona, Role of a-synuclein regions in nucleation and elongation of amyloid fiber assembly, (2020), *ACS Chem. Neurosci.* 11, 872-879.
- Gath J., Bousset L., Habenstein B., Melki R., Böckmann A., Meier BH. (2014), Unlike twins : an NMR comparison of two a-synuclein polymorphs featuring different toxicity, *PLoS One*, 5 ;9(3) :e90659.
- Gath J., Habenstein B., Bousset L., Melki R., Meier BH., Böckmann A., Solid-state NMR sequential assignments of a-synuclein (2012), *Biomolecular NMR Assignments*, 6(1) :51-55.
- Ghee M., Melki R., Michot N., Mallet J., PA700, the regulatory complex of the 26S proteasome, interferes with a-synuclein assembly, (2005), *FEBS J.*, 272(16):4023-33.
- Giasson B.I., Murray I.V.J., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of a-synuclein is essential for filament assembly, (2000), *Journal of biological chemistry* 276(4), 2380-2386.

- Goedert M., Jakes R., Crowther R.A., Hasegawa M., Smith M.J., Spillantini M.G., Intraneuronal filamentous tau protein and alpha-synuclein deposits in neurodegenerative diseases, (1998), *Biochem Soc Trans.*, 26(3):463-71
- Greten-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M., Diao L., Williams A.M., Nie E.H., Malani S., Tian N., Castillo P.E., Buchman V.L., Chandra S.S., $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction, (2010), *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 107(45):19573-8.
- Guerrero-Ferreira R., Taylor N.M., Arteni A.A., Kumari P., Mona D., Ringler P., Britschgi M., Lauer M.E., Makky A., Verasdonck J., Riek R., Melki R., Meier B. H., Böckmann A., Bousset L., Stahlberg H., (2019), Two new polymorphic structures of human full-length alpha-synuclein fibrils solved by cry-electron microscopy, *Elife*, e48907.
- Guerrero-Ferreira R., Taylor N.M., Mona D., Ringler P., Lauer M.E., Britschgi M., Stahlberg H., Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils, (2018), *Elife*, 7:e36402.
- Gustot A., Gallea J.I., Sarroukh R., Celej M.S., Ruyschaert J.M., Raussens V., Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in Parkinson's disease, (2015), *1;471(3):323-33*.

H

- 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., α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells, (2011), *J Clin Invest.*, 121(2):715-25.
- Hawkes C.H., Del Tredici K., Braak H., Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis, (2007), *Neuropathology and applied neurobiology*, 33, 599-614.
- Hecker R., Taraboulos A., Scott M., Pan K.M., Yang S.L., Torchia M., Jendroska K., DeArmond J., Prusiner S.B., Replication of distinct scrapie prion isolates is region specific in brains of transgenic mice and hamsters, (1992), *Genes & development* 6:1213-1228.
- Hirsch E., Graybiel A.M., Agid Y.A., Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease, (1988), *Nature*, 28;334(6180):345-8.
- 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., Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific protopathic seeds, (2013), *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 13;110(33):E3138-47.

- Hossain S., Alim A., Takeda K., Hiroyuki K., Shinoda T., Uéda K., Limited proteolysis of NACP/a-synuclein, (2001), *Journal of Alzheimer's Disease*, Vol.3, no6, pp. 577-584.

I

- Jacob R.E. and Engen J.E., Hydrogen exchange mass spectrometry: Are we out of the quicksand ? (2012), *J Am Soc Mass Spectrom.*, 23(6): 1003-1010.
- Ichikawa M., Kuramoto K., Kobayashi K., Kawahara M., Kuroda Y., Formation and maturation of synapses in primary cultures of rat cerebral cortical cells: An electron microscopic study, (1993), 16(2):95-103.
- Ihse E., Yamakado H., Van Wijk X.M., Lawrence R., Esko J.D., Masliah E., Cellular internalization of alpha-synuclein aggregates by cell surface heparan sulfate depends on aggregate conformation and cell type, (2017), 21;7(1):9008.
- Illes-Toth E., Rempel D.L., Gross M.L., Pulsed HDX illuminates the aggregation kinetics of alpha-synuclein, the causative agent for Parkinson's disease, (2019), *ACS Chem Neurosci.* 20;9(6):1469-1476.
- Ishii A., Nonaka T., Taniguchi S., Saito T., Arai T., Mann D., Iwatsubo T., Hisanaga S., Goedert M., Hasegawa M., Casein kinase 2 is the major enzyme in brain that phosphorylates Ser129 of human alpha-synuclein: Implication for alpha-synucleinopathies, (2007), *FEBS Lett.*, 2;581(24):4711-7.

J

- Jakes R., Spillantini M.G., Goedert M., Identification of two synucleins from human brain, (1994), *FEBS letters* 345, 27-32.
- Jankovic J. (2008), Parkinson's disease : clinical features and diagnosis, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79 :368-376
- Jankovic J., Goodman I., Safirstein B., Marmon T.K., Schenk D.B., Koller M., Zago W., Ness D.K., Griffith S.G., Grundman M., Soto J., Ostrowitzki S., Boess F.G., Martin-Facklam M., Quinn J.F., Isaacson S.H., Omidvar O., Ellenbogen A., Kinney G.G., Safety and tolerability of multiple ascending

doses of PRX002/RG7935, an anti- α -synuclein monoclonal antibody, in patients with Parkinson disease: A randomized clinical trial, (2018), *JAMA Neurol.*, 1;75(10):1206-1214.

- Jensen P.H., Nielsen M.S., Jakes R., Dotti C.G., and Goedert M., Binding of α -synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation, (1998), *The journal of biological chemistry*, Vol. 273, No. 41, Issue 9, pp. 26292-26294.
- Jin H., Kanthasamy A., Ghosh A., Yang Y., Anantharam V., Kanthasamy A.G., α -Synuclein regulates protein kinase C δ expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity, (2011), *Journal of Neuroscience*, 31(6):2035-2051.

K

- Kasai T., Tokudae T., Yamaguchi N., Watanabe Y., Kametani F., Nakagawa M., Mizuno T., Cleavage of normal and pathological forms of α -synuclein by neurosin *in vitro*, (2008), *Neurosci. Lett.*, 2;436(1):52-6.
- Kellie J.F., Higgs R.E., Ryder J.W., Major A., Beach T.G., Adler C.H., Merchant K., Knierman M.D., Quantitative measurement of intact α -synuclein proteoforms from post-mortem control and Parkinson's disease brain tissue by intact protein mass spectrometry, (2014), *Sci Rep.*, 23;4:5797.
- Kim S., Kwon S.H., Kam T.I., Karuppagounder S.S., Lee S., Lee J.H., Kim W.R., Kook M., Foss C.A., Shen C., Lee H., Kulkarni S., Pasricha P.J., Lee G., Pomper M.G., Dawson V.L., Dawson T.M., Ko H.S., Transneuronal propagation of pathologic α -synuclein from the gut to the brain models Parkinson's disease, (2019), 21;103(4):627-641.e7.
- Kim K.S., Choi Y.R., Park J.Y., Kim D.K., Lee S.J., Paik S.R., Jou I., Park S.M., Proteolytic cleavage of extracellular α -synuclein by plasmin: implications for Parkinson disease, (2012), *J Biol Chem.*, 20;287(30):24862-72.

L

- Langston J. W. (2017) The MPTP story, *J Parkinson Dis.*, 7 (Suppl 1) : S11-S19.
- Lau A., So R.W.L., Lau H.H.C., Sang J.C., Ruiz-Riquelme A., Fleck S.C., Stuart E., Menon S., Visanji N.P., Meisl G., Faidi R., Marano M.M., Schmitt-Ulms C., Wang Z., Fraser P.E., Tandon A., Human B.T., Wille H., Ingelsson M.,

- Klennerman D., Watts J.C., α -Synuclein strains target distinct brain regions and cell types, (2020), *Nat Neurosci.* 23(1):21-31.
- Lee H.J., Patel S., Lee S.J., Intravesicular localization and exocytosis of α -synuclein and its aggregates, (2005), *J Neurosci.* 22;25(25):6016-24.
 - Lee H.J., Suk J.E., Bae E.J., Lee S.J., Clearance and deposition of extracellular α -synuclein aggregates in microglia, (2008), *J Neurosci.* 1;372(3):423-8.
 - Levigoureux E., Vers l'imagerie in vivo de l' α -synucléine, (2015), HAL.
 - Lewy, F. (1912). Paralysis agitans. *Handbuch Der Neurologie* 3, 920–933.
 - Li B., Ge P., Murray K.A., Sheth P., Zhang M., Nair G., Sawaya M.R., Shin W.S., Broyer D.R., Ye S., Eisenberg D.S., Zhou Z.H., Jiang L., Cryo-EM full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel, (2018), *Nat. Commun.*, 6;9(1):3609.
 - Li J.Y., Englund E., Holton J.L., Soulet D., Hagell P., Lees A. J., Lashley T., Quinn N. P., Rehn Crona S., Björklund A., Widner H., Revesz T., Lindvall O., Brundin P. (2008), Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation, *Nat. Med.*, 14(5):501-3.
 - Li Y., Zhao C., Luo F., Liu Z., Gui X., Luo Z., Zhang X., Li D., Liu C., Li X., Amyloid fibril structure of α -synuclein determined by cry-electron microscopy, (2018), *Cell Res.*, 28(9):897-903.
 - Liautard J.P., Alvarez-Martinez M.T., Féraudet C., Torrent J., The prion protein: structure, dynamics and *in vitro* conversion, (2002), *Med Sci (Paris)*, 18:62-69.
 - Liberski P.P., Gajos A., Sikorska B., Lindenbaum S., Kuru, the first human prion disease, (2019), *Viruses*, 7;11(3):232.
 - Liddel S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., Benette M.L., Munch A.E., Chung W.S., Peterson T.C., Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia, (2017), *Nature*, 541:481-487.
 - Lin X.J., Zhang F., Xie Y.Y., Bao W.J., He J.H., Hu H.Y., Secondary structural formation of α -synuclein amyloids as revealed by g-factor of solid-state circular dichroism, (2006), *Biopolymers*, Vol.83, 226-232.

- Loria F., Vargas J.Y., Bousset L., Syan S., Salles A., Melki R., Zurzolo C., a-synuclein transfer between neurons and astrocytes indicates that astrocytes play a role in degradation rather than in spreading, (2017), *Acta Neuropathol*, 134:789-808.
- Lou H., Montoya S.E., Alerte T.N., Wang J., Wu J., Peng X., Hong C.S., Friedrich E.E., Mader S.A., Pedersen C.J., Marcus B.S., McCormack A.L., Di Monte D.A., Daubner S.C., Perez R.G., Serine 129 phosphorylation reduces the ability of alpha-synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A *in vitro* and *in vivo*, (2010), *J Biol Chem*, 4;285(23):17648-61.

M

- Makky A., Bousset L., Polesel-Maris J., Melki R. (2016), Nanomechanical properties of distinct fibrillar polymorphs of the protein a-synuclein, *Scientific reports*, 6:37970.
- Mandell J. G., Falick A. M., Komives E. A., Measurement of amide hydrogen exchange by MALDI-TOF mass spectrometry, (1998), *Anal. Chem.*, 70, 3987-3995.
- Manetto V., Perry G., Tabaton M., Mulvihill P., Smith H.T., Gambetti P., Autillio-Gambetti L., Ubiquitin is associated with abnormal cytoplasmic filaments characteristic of neurodegenerative diseases, (1998), *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(12) : 4501-4505.
- 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., Dawson V.L., Ko H.S., Dawson T.M., Pathological a-synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3, (2016), *Science*, 30;353(6307).
- Maroteaux L., Campanelli J.T., and Scheller R.H., Synucleine: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal, (1988), *The Journal of Neuroscience*, 8(8): 2804-2815.

- Marsili L., Rizzo G., and Colosimo C., Diagnostic criteria for Parkinson's disease: from James Parkinson to the concept of prodromal disease, (2018), *Frontiers in Neurology*, 9:156.
- Masliah E., Rockenstein E., Adame A., Alford M., Crews L., Hashimoto M., Seubert P., Lee M., Goldstein J., Chilcote T., Games D., Schenk D., Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease, (2005), *Neuron*, 16;46(6):857-68.
- Mbefo M.K., Paleologou K.E., Boucharda A., Oueslati A., Schell H., Fournier M., Olschewski D., Yin G., Zwecksteter M., Masliah E., Kahle P.J., Hirling H., Lashuel H.A., Phosphorylation of synucleins by members of the polo-like kinase family, (2010), *J Biol Chem*, 285(4),2807-22.
- McCann H., Stevens C.H., Cartwright H., Halliday G.M., (2014), α -Synucleinopathy phenotypes, Parkinsonism and related disorders, 20S1 S62-S67.
- McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor JP, Weintraub D, Aarsland D, Galvin J, Attems J, Ballard CG, Bayston A, Beach TG, Blanc F, Bohnen N, Bonanni L, Bras J, Brundin P, Burn D, Chen-Plotkin A, Duda JE, El-Agnaf O, Feldman H, Ferman TJ, Ffytche D, Fujishiro H, Galasko D, Goldman JG, Gomperts SN, Graff-Radford NR, Honig LS, Iranzo A, Kantarci K, Kaufer D, Kukull W, Lee VMY, Leverenz JB, Lewis S, Lippa C, Lunde A, Masellis M, Masliah E, McLean P, Mollenhauer B, Montine TJ, Moreno E, Mori E, Murray M, O'Brien JT, Orimo S, Postuma RB, Ramaswamy S, Ross OA, Salmon DP, Singleton A, Taylor A, Thomas A, Tiraboschi P, Toledo JB, Trojanowski JQ, Tsuang D, Walker Z, Yamada M, Kosaka K, Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of DLB consortium, (2017), *Neurology*. 89(1):88-100.
- Melki R., How the shapes of seeds can influence pathology, (2018), *Neurobiology of disease*, 109:201-208.
- Miake H., Mizusawa H., Iwatsubo T., Hasegawa M., Biochemical characterization of the core structure of α -synuclein filaments, (2002), *J Biol Chem*, 277(21), 19213-9.
- Milanesi L., Sheynis T., Xue W.F., Orlova E.V., Hellewell A.L., Jelinek R., Hewitt E.W., Radford S.E., Saibil H.R., Direct three-dimensional visualization of membrane disruption by amyloid fibrils, (2012), *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 11;109(50):20455-20460.

- Mochizuki H., Yamada M., Mizuno Y., Alpha-synuclein overexpression model, (2006), J Neural Transm Suppl, (70):281-4.
- Moisan F., Kad S., Moutengou E., Boussac-Zerebska M., Carcaillon-Bentata L., Elbaz A., Fréquence de la maladie de Parkinson en France. Données nationales et régionales 2010-2015, Santé public France, (2018).
- Moretti V. D., Available and future treatments for atypical parkinsonism. A systematic review, (2019), CNS Neurosci. There., 25(2): 159-174.
- Murray I.V.J., Giasson B.I., Quinn S.M., Koppaka V., Axelsen P.H., Ischiropoulos H., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y., Role of a-synuclein carboxy-terminus on fibril formation *in vitro*, (2003), Biochemistry, 42,28,8530-8540.

N

- Nazabal A., Schlitter J.M., Hydrogen-deuterium exchange analyzed by matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry and the HET-s prion model, (2006), Methods Enzymol., 413:167-81.
- Niranjana R., The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes, Mol Neurobiol., (2014), 49(1):28-38

O

- O'Brien D., Durand D., Voegelé A., Hourdel V., Davi M., Chamot-Rooke J., Vachette P., Brier S., Ladant D., Chenal A., Calmodulin fishing with a structurally disordered bait triggers CyaA catalysis, (2017), PLoS Biol., 15(12):E2004486.
- Oosawa F., Asakura S., Thermodynamics of the polymerization of protein, (1975), Academic Press Inc.
- Ostrerova N., Petrucelli L., Farrer M., Mehta N., Choi P., Hardy J., Wolozin B., alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins, (1999), J Neurosci., 19(14):5782-91.

P

- Parchi P., Chen S.G., Brown P., Zou W., Capillair S., Hainfellner J., Reyes P.F., Golden G.T., Hauw J.J., Gajdusek D.C., Gambetti P., Different patterns of truncated prion protein fragment correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, (1998), Proc Natl Acad Sci U.S.A., 95(14):8322-7.

- Park S.M., Jung H.Y., Kim T.D., Park J.H., Yang C.H., Kim J., Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of α -synuclein, a molecular chaperone, (2002), *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, No32, pp. 28512-28520.
- Parkinson J. (1817), *An Essay on the Shaking Palsy*, réédition : *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14 :2, 2002
- Paxinou E., Chen Q., Weisse M., Giasson B.I., Norris E.H., Rueter S.M., Trojanowski J.Q., Lee V.M., Ischiropoulos H., (2001), *J Neurosci.*, 15;21(20):8053-61.
- Peelaerts W., Bousset L., Baekelandt V., Melki R., α -synuclein strains and seeding in Parkinson's disease, incidental Lewy body disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy: similarities and differences, (2018), *Cell Tissue Res.*, 373(1):195-212.
- Peelaerts W., Bousset L. Van der Perren a., Moskalyuk A., Pulizzi M., Van den Haute C., Melki R., Baekelandt V., (2015), α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration, *Nature*, V522, 340:344.
- Peng C., Gathagan R.J., Covell D.J., Medellin C., Streber A., Robinson J.L., Zhang B., Pitkin R.M., Olufemi M.F., Luk K.C., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y., Cellular milieu imparts distinct pathological α -synuclein strains in α -synucleinopathies, (2018), *Nature*, Vol.552, Issue 7706, p558-563.
- Peng C., Gathagan R.J., Lee V.M.Y., Distinct α -synuclein strains and implications for heterogeneity among α -synucleinopathies, (2018), *Neurobiol Dis.*, 109(Pt B):209-218.
- Perez R.G., Editorial: The protein α -synuclein: its normal role (in neurons) and its role in disease, (2020), 20;14:116.
- Perez R.G., Waymire J.C., Lin E., Liu J.J., Guo F., Zsigmond M.J., A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis, (2002), 15;22(8):3090-9.
- Pieri L., Chafey P., Le Gall M., Clary G., Melki R., Redeker V., Cellular response of human neuroblastoma cells to α -synuclein fibrils, the main constituent of Lewy bodies, (2015), *Biochemical et Biophysica Acta* 1860, 8-19.
- Pinho R., Paiva I., Jercic K.G., Fonseca-Ornelas L., Gerhardt E., Fahlbusch C., Garcia-Esparcia P., Kerimoglu C., Parlou M.A.S., Villar-Piqué A., Szego E., Lopes de Fonseca T., Odoardi F., Soeroes S., Rego A.C., Fischle W.,

Schwamborn J.C., Meyer T., K gler S., Ferrer I., Attems J., Fischer A., Becker S., Zweckstetter M., Borovecki F., Outeiro T.F., (2019), Nuclear localization and phosphorylation modulate pathological effects of alpha-synuclein, *Hum Mol Genet.*, 1;28(1):31-50.

- Pirrone G. F., Wang H., Canfield N., Chin A. S., Rhodes T. A., Makarov A., Use of MALDI-MS combined with differential hydrogen-deuterium exchange for semiautomated protein global conformational screening, (2017), *Anal. Chem.*, 89, 8351-8357.
- Plotkin S.S., Cashman N.R., Passive immunotherapies targeting A β and tau in Alzheimer's disease, (2020), *Neurobiol Dis.*, 144: 105010.
- Polverino de Laureto P., Tosato L., Frare E., Marin O., Uversky V.N., Fontana A., Conformational properties of the SDS-bound state of a-synuclein probed by limited proteolysis: unexpected rigidity of the acidic C-terminal tail, (2006), *Biochemistry*, 45, 38, 11523-11531.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.
- Postuma R. B., Berg D., Stern M., Poewe W., Olanow W.C., Oertel W., Obeso J., Marek K., Litvan I., Lang A.E., Halliday G., Goetz C.G., Gasser T., Dubois B., Chan P., Bloem B.R., Adler C.H., Deuschl G., MDS Clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease, (2015), *Movement Disorders*, Vol. 30, No. 12.
- Provin A.N., Morris A.J., Surguchov A., Benovic J.L., Synucleins area novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases, (2000), *J Biol Chem* 275(34), 26515-22.
- Prunier S.B., Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, (1982), *Science*, 9;216(4542):136-44.

Q

- Qiao L., Hamamichi S., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Yacoubian T.A., Wilson S., Xie Z.L., Speake L.D., Parks R., Crabtree D., Crimsons S., Schneider L., Uchiyama Y., Iwatsubo T., Zhou Y., Peng L., Lu Y., Standaert D.G., Walls K.C., Shacka J.J., Roth K.A., Zhang J., Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity, (2008), 21;1:17.

R

- Redeker V., Halgand F., Le Caer J-P., Bousset L., Lapr v te O., Melki R., Hydrogen/Deuterium exchange mass spectrometric analysis of conformational changes accompanying the assembly of the yeast prion Ure2p into protein fibrils, (2007), *J. Mol. Biol.*, 369, 1113-1125.
- Rey N. L., Bousset L., George S., Madan Z., Meyerdirk L., Schulz E., Steiner J. A., Melki R., Brundin P., α -Synuclein conformational strains spread, seed and target neuronal cells differentially after injection into the olfactory bulb., (2019), *Acta Neuropathol Commun.*, 30;7(1):221.
- Rodriguez J.A., Ivanova M.I., Sawaya M.R., Cascio D., Reyes F., Shi D., Sangwan S., Guenther E.L., Johnson L.M., Zhang M., Jiang L., Arbing M.A., Nannega B., Hattne J., Whitelegge J., Brewster A.S., Messerschmidt M., Boutet S., Sauter N.K., Gonen T., and Eisenberg D., (2015), Structure of the toxic core of α -synuclein from invisible crystals, *Nature*, 24;525(7570):486-490.
- Ross G.W., Abbott R.D., Petrovich H., Morens D.M., Grandinetti A., Tung K.H., Tanner C.M., Masaki K.H., Blanchette P.L., Curb J.D., Popper J.S., White L.R., Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease, (2000), *JAMA*, 24-31;283(20):2674-9.
- Ruttkies C., Schymanski E.L., Strehmel N., Hollender J., Neumann S., Williams A.J., Krauss M., Supporting non-target identification by adding hydrogen deuterium exchange MS/MS capabilities to MetFrag, (2019), *Anal Banal Chem.*, 411(19): 4683-4700.

S

- Saborlo G.P., Permanne B., Soto C., Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding, (2001), *Nature (London)*, 411(6839):810-813.
- Sailer A., B eler H., Fischer M., Aguzzi A., Weissmann C., No propagation of prions in mice devoid of PrP, (1994), *Cell*, 1;77(7):967-8.
- Samuel F., Flavin W.P., Iqbal S., Pacelli C., Sri Renganathan S.D., Trudeau L.E., Campbell E.M., Fraser P.E., Tandon A., Effects of serine 129 phosphorylation on α -synuclein aggregation, membrane association, and internalization, (2016), *J Biol Chem*, 26;291(9):4374-85.
- Schildge S., Bohrer C., Beck K., Schachtrup C., Isolation and culture of mouse cortical astrocytes, (2013), *J. Vis Exp.*, (71):50079.

- Schneeberger A., Lanay T., Mandler M., Active immunization therapies for Parkinson's disease and multiple system atrophy, (2016), Movement Disorders, Vol. 31, No. 2.
- Serpell L. C., Berriman J., Jakes R., Goedert M., Crowther R.A. (2000), Fiber diffraction of synthetic α -synuclein filaments shows amyloid-like cross- β conformation, V97, I9, 4897-4902.
- Setzinger G.M., Fisher B.E., McEwen S., Beeler J.A., Walsh J.P., Lakowec M.W., Exercise-enhanced neuroplasticity targeting motor and cognitive circuitry in Parkinson's disease, (2013), Lancet Neurol., 12(7):716-26.
- Seveler D., Jiang P., Yen S.H., Cathepsin D is the main lysosomal enzyme involved in the degradation of α -synuclein and generation of its carboxy-terminally truncated species, (2008), Biochemistry, 47(36):9678-87.
- Shahmoradian S. H., Lewis A. J., Lauer M. E. (2019), Lewy pathology in Parkinson's disease consist of crowded organelles and lipid membranes, Nature Neuroscience 22, 1099-1109.
- Shahnawaz M., Mukherjee A., Pritzkow S., Mendez N., Rabadia P., Liu X., Scmeichel A., Singer W., Wu G., Tsai A.L., Shirani H., Nilsson P.R., Low P.A., Soto C., Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy, (2020), Nature, 578(7794): 273-277.
- Shrivastava A. N., Bousset L., Renner M., Redeker V., Savistchenko J., Triller A., Melki R., Differential membrane binding and seeding of distinct α -synuclein fibrillar polymorphs, (2020), Biophys J., 118, 1-20.
- Solassol J., Crozet C., Lehmann S., Prion propagation in cultured cells, (2003), British Medical Bulletin, Vol 66, Issue 1, p87-97.
- Song Y.J.C., Halliday G.M., Holton J.L., Lashley T., O'Sullivan S.S., McCann H., Lees J.A., Ozawa T., Williams D.R., Lockhart P.J., Revesz T.R., Degeneration in different parkinsonian syndromes relates to astrocytes type and astrocyte protein expression, (2009), J. Neuropathol Exp Neurol., oct;68(10):1073-83.
- Sorrentino Z.A., Giasson B.I., Chakrabarty P., α -Synuclein and astrocytes: tracing the pathways from homeostasis to neurodegeneration in Lewy body disease, (2019), Acta Neuropathol., 138(1):1-21.
- Souza J.M., Giasson B.I., Lee V.M., Ischiropoulos H., Chaperone-like activity of synucleins, (2000) FEBS Lett., 26;474(1):116-9.

- 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 USA*, 95(11) :6469-6473.
- Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Cairns N.J., Lantos P.L., Goedert M., Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, (1998), *Neuroscience Letters* 251, 205-208.
- Stahl N., Baldwin M.A., Teplow D.B., Hood L., Gibson B.W., Burlingame A.L., Prusiner S.B., Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing, (1993), *Biochemistry*, 2;32(8):1991-2002.
- Stefanis L., Emmanouilidou E., Pantazopoulou M., Kirk D., Vekrellis K., Tofaris G., How is α -synuclein cleared from the cell ? (2019), *Journal of Neurochemistry*, 150; 577-590.
- Stefanis L., Larsen K.E., Rideout H.J., Sulzer D., Greene L.A., Expression of A53T mutant but not wild-type α -synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death, (2001), 15;21(24):9549-60.
- Steiner J.A., Quansah E., Brundin P., The concept of α -synuclein as a prion-like protein: ten years after, (2018) *Cell Tissues Res.*, 373(1):161-173.
- Strohäker T., Jung B.C., Liou S.H., Fernandez C.O., Riedel D., Becker S., Halliday G.M., Bennati M., Kim W.S., Lee S.J., Zwecksteter M., Structural heterogeneity of α -synuclein fibrils amplified from patient brain extracts, (2019), *Nat. com.*, 10:535.
- Sung J.Y., Park S.M., Lee C.H., Kim J., Oh Y.J., Lee S.T., Paik S.R., Chung K.C., Proteolytic cleavage of extracellular secreted (α)-synuclein via matrix metalloproteinases, (2005), *J. Biol. Chem.*, 1;280(26):25216-14

T

- Tanner C.M., Kamel F., Ross G.W., Hoppin J.A., Goldman S.M., Korell M., Marras C., Bhudhikanok G.S., Kasten M., Chade A.R., Comics K., Richards M.B., Meng C., Priestley B., Fernandez H.H., Cambi F., Umbach D.M., Blair A., Sandler D.P., Langston J.W., Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease, (2011), *Environ Health Perspect.*, 119(6):866-72.

- Tanner C.M., Ottman R., Goldman S.M., Ellenberg J., Chan P., Mayeux R., Langston J.W., Parkinson disease in twins: an etiologic study, (1999), JAMA, 27;281(4):341-6.
- Teiller F.X., Binolfi A., Bekei B., Martorana A., Rose H.M., Stuiver M., Verzink S., Lorenz D., Van Rossum M., Goldfarb D., Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells, (2016), Nature, 530(7588):45-50.
- Tofaris G.K., Layfield R., Spillantini M.G., α -synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome, (2001), FEBS Lett., 30 ;509(1) :22-6.
- Tsiatsiani L., Akeroyd M., Olsthoorn M., Heck A.J., Aspergillus niger propyl endoprotease for hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry and protein structural studies, (2017), 1;89(15):7966-7973.
- Tsunemi T., Ishiguro Y., Yoroisaka A., Valdez C., Miyamoto K., Ishikawa K., Saiki S., Akamatsu W., Hattori N., Krainc D., Astrocytes protect human dopaminergic neurons from α -synuclein accumulation and propagation, J. Neurosci., 12;JN-RM-0954-20, (2020).
- Tuttle M.D., Comellas G., Nieuwkoop A.J., Covell D.J., Berthold D.A., Kloepper K.D., Courtney J.M., Kim J.K., Barclay A.M., Kendall A., Wan W., Stubbs G., Schwieters C.D., Lee V.M.Y., George J.M., Rienstra C.M., Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein, (2018), Nat Struct Mol Biol., 23:409-15.

U

- Uversky V.N., Li J., Fink A.L., Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein, (2001), The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 47, pp 44284-44296.
- Uversky V.N., Li J., Souillac P., Millett I.S., Doniach S., Jakes R., Goedert M., Fink A.L., Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of α -synuclein assembly by β - and γ -synucleins, (2002), J Biol Chem., 5;277(14):11970-8.

V

- Van der Perren A., Gelders G., Fenyi A., Bousset L., Brito F., Peelaerts W., Van den Haute C., Gentleman S., Melki R., Baekelandt V., The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies (2020), Acta Neuropathol.

- Vassar P.S., Culling C.F., Fluorescent strains, with special reference to amyloid and connective tissues, (1959), Arch Pathol., 68:487-498
- Verasdonck J., Bousset L., Gath L., Melki R., Böckmann A., Meier BH. (2016), Further exploration of the conformational space of α -synuclein fibrils: solid-state NMR assignment of a high-pH polymorph, Biomol NMR Assign., 10(1) :5-12.
- Vilar M., Chou H-T., Lührs T., Maji S. K., Riek-Loher D., Verel R., Manning G., Stahlberg H., Riek R. (2008) The fold of α -synuclein fibrils, PNAS, 105 (25) 8637-8642.
- Villar-Piqué A., Lopes da Fonseca T., Outeiro T.F., Structure, function and toxicity of α -synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies, (2016), J Neurochem., 139 Suppl 1:240-255.
- Vinh J., Loyaux D., Redeker V., Rossier J., Sequencing branched peptides with CID/PSD MALDI-TOF in the low picomole range: application to the structural study of the posttranslational polyglycylation of tubulin, (1997), Anal. Chem, 69, 3979-3985.
- Volpicelli-Baley L. and Brundin P., Prion-like mechanism in Parkinson disease, (2018) Handb Clin Neurol., 153: 321-335.
- Von Bergen M., Barghorn S., Müller S.A., Pickhardt M., Biernat J., Mandelkow E.M., Davies P., Aebi U., Mandelkow E., The core of Tau-paired helical filaments studied by scanning transmission electron microscopy and limited proteolysis, Biochemistry, (2006), 45, 20, 6446-6457.

W

- Wakabayashi K., Tanji K., Odagiri S., Miki S., Mori F., Takahashi H., The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders (2012), Molecular Neurobiology, 47, 495-508.
- Wakabayashi K., Yoshimoto M., Tsui S., Takahashi H., α -synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy, (1998), Neurosci. Lett., 19;249(2-3):180-2.
- Walker L., Leonidas S. and Attems J., (2019), Clinical and neuropathological differences between Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia and dementia with Lewy bodies – current issues and future directions. J. Neurochem, 150, 467-474.

- Walters B.T., Ricciuti A., Mayne L., Englander S.W., Minimizing back exchange in the hydrogen exchange-mass spectrometry experiment, (2012), J Am Soc Mass Spectrom., 23(12): 2132-2139.
- Wang W, Nguyen LT, Burlak C, Chegini F, Guo F, Chataway T, Ju S, Fisher OS, Miller DW, Datta D, Wu F, Wu CX, Landeru A, Wells JA, Cookson MR, Boxer MB, Thomas CJ, Gai WP, Ringe D, Petsko GA, Hoang QQ, Caspase-1 causes truncation and aggregation of the Parkinson's disease associated protein α -synuclein, (2016), Proc Natl Acad Sci U.S.A., 23;113(34):9587-92.
- Webb J.L., Ravikumar B., Atkins J., Skipper J.N., Rubinsztein D.C., α -synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome, (2003), 4;278(27):25009-13.
- Weinreb P.H., Zhen W., Poon A.W., Conway K.A., Lansbury P.T. jr, NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded, (1996), Biochemistry, 29;35(43):13709-15.
- Weirsinger C., Sidhu A., Attenuation of dopamine transporter activity by α -synuclein, (2003), Neurosci Lett., 17;340(3):189-92.
- Westaway D., Prusiner S.B., Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein, (1986), 11;14(5):2035-2044.
- Wyss-Coray T., Loike J.D., Brionne T.C., Lu E., Anankov R., Yan F., Silverstein S.C., Husemann J., Adult mouse astrocytes degrade amyloid-B in vitro and in situ, (2003), Nat Med, 9(4):453-7.

X

Y

- Yamanaka H., He X., Matsumoto K., Shiosaka S., Yoshida S., Protease M/neurosin mRNA is expressed in mature oligodendrocytes, (1999), Brain Res Mol Brain Res., 25;71(2):217-24.
- Yamasaki T.R, Holmes B.B., Furman J.L., Dhavale D.D., Su B.W., Song E.S., Cairns N.J., Kotzbauer P.T., Diamond M.I., Parkinson's disease and multiple system atrophy have distinct α -synuclein seed characteristics, (2019), J Biol Chem, 18;294(3):1045-1058.
- Ye Z.C., Sontheimer H., Astrocytes protect neurons from neurotoxic injury by serum glutamate, (1998), Glia, 22(3):237-48.

Z

- Zhang Z. and Smith D.L., Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation, (1993), Protein Sci., 2(4): 522-531.
- Zinger A., Barcia C., Herrero M.T., Guillemin G.J., The involvement of neuroinflammation and kynurenine pathway in Parkinson's disease, (2011), Parkinson's disease, Volume 2011, Article ID 716859.
- Zucca FA, Segura-Aguilar J, Ferrari E, Munoz P, Paris I, Sulzer D, Sarna T, Casella L, Zecca L. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease, (2015), Prog Neurobiol. 9:S0301-0082(15)00101-X

Titre : Développement d'outils thérapeutiques ciblant la propagation des agrégats d'alpha-synucléine dans les synucléinopathies

Mots clés : alpha-synucléine, synucléinopathies, souches, cartographie de surface

Résumé : L'agrégation d'alpha-synucléine et la propagation de ces agrégats de neurone à neurone ont, de manière récurrente, été montrées comme étant au cœur du processus physiopathologique de différentes maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, les démences à corps de Lewy ou les atrophies multisystématisées. Bien que ces synucléinopathies aient en commun la présence de dépôts fibrillaires riches en alpha-synucléine, les phénotypes pathologiques sont différents. Notre hypothèse est que la présence de différentes "souches" d'alpha-synucléine fibrillaires présentant différentes affinités, tropismes, propriétés d'internalisation et de propagation pourrait expliquer l'hétérogénéité physiopathologique et clinique retrouvée dans la maladie de Parkinson et les autres synucléinopathies. Le but de ce projet était de déterminer comment interférer avec la liaison et la propagation "prion-like" de ces assemblages d'alpha-synucléine dans les neurones. Dans cet objectif, nous avons caractérisé les surfaces de trois souches d'alpha-synucléine. Dans un premier temps, nous avons mis en place des approches *in vitro* de protéolyses ménagées et de marquages hydrogène-deutérium combinées à la spectrométrie de masse qui nous ont permis de cartographier la surface d'agrégats fibrillaires d'alpha-synucléines générés *in vitro*. Dans un second temps, nous avons étudié la prise en charge de différentes souches d'alpha-synucléine par des cultures primaires de neurones ou d'astrocytes afin d'analyser les caractéristiques de dégradation des souches *in cellulo*, liées à leurs spécificités de surface déterminées préalablement. La cartographie réalisée ouvre la voie, à long terme, au développement d'outils diagnostics ou thérapeutiques hautement spécifiques capables de reconnaître spécifiquement différentes souches d'alpha-synucléine ou d'inhiber la propagation de cellule à cellule de ces agrégats afin de ralentir ou d'arrêter la progression de la maladie.

Title : Therapeutic tools targeting alpha-synuclein assemblies propagation in synucleinopathies

Keywords : alpha-synuclein, synucleinopathies, strains, surface mapping

Abstract: The aggregation of alpha-synuclein and the spread of aggregates from neuron to neuron have been consistently shown to be at the heart of the pathophysiological process of devastating neurodegenerative diseases like Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies or multiple system atrophy. While fibrillar alpha-synuclein rich deposits are a common hallmark of synucleinopathies, distinct pathological phenotypes are observed. We hypothesize that different "strains" of fibrillar alpha-synuclein with different affinity/tropism, internalization and seeding properties, may account for the patho-physiological and clinical heterogeneity in Parkinson's disease and other synucleinopathies. We aim to determine a way to interfere with the binding to neurons of distinct alpha-synuclein assemblies and their prion-like propagation. To this end, we mapped the surface of three distinct alpha-synuclein strains. First, we implemented limited proteolysis and hydrogen-deuterium approaches combined to mass spectrometry in order to map, *in vitro*, the solvent exposed-surfaces of fibrillar alpha-synuclein assemblies generated *in vitro*. Second, we studied the processing of different alpha-synuclein strains using primary cultures of neurons and astrocytes in order to analyze the strain degradation characteristics *in cellulo*, related to the surface specificities determined *in vitro*. Mapping the surfaces of those assemblies and identification of exposed and protected strain-specific sequences open the way, in the long term, for developing highly specific binders that might either detect specific alpha-synuclein strains or inhibit cell-to-cell propagation disease progression.