

Titre: Effet de souches fibrillaires d' α -synucléine et d'assemblages de β -amyloïde sur la logistiquendo-lysosomale dans des neurones corticaux de souris en culture

Mots clés: maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, agrégats protéiques toxiques, cultures primaires de neurones, transport intracellulaire, nanodiamants fluorescents

Résumé: L'altération du transport axonal est récemment apparue comme un trait caractéristique commun à plusieurs maladies neurodégénératives (MN). Des anomalies précoces du transport intraneuronal ont ainsi été proposées comme traits phénotypiques communs aux MN, telles que la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (MP). Il existe des preuves indubitables que l'accumulation anormale dans le cerveau de protéines mal repliées, notamment l' α -synucléine (α -syn) dans la MP et la l'amyloïde β ($A\beta$) dans la MA, est un mécanisme physiopathologique clé qui sous-tend la neurotoxicité observée dans ces troubles liés à l'âge. En outre, les protéines mal repliées se rassemblent pour former des assemblages non solubles de différentes espèces, notamment des polymorphes fibrillaires (de type fibrille [α -synF] ou ruban [α -synR] pour l' α -syn, et fibrille uniquement pour l' $A\beta$) ou oligomériques pour l' $A\beta$. Ces différents agrégats sont suspectés d'être à l'origine de la grande diversité de toxicités observée dans les MN. Il existe des preuves que ces agrégats affectent le transport endosomal, qui est essentiel à la mise en place des compartiments neuronaux, au maintien de leur dynamique et à leur bon fonctionnement. Cependant, peu d'études ont étudié, dans les mêmes neurones, les effets sur le transport endosomal des différents types d'assemblages ainsi que leur propre transport. Cette thèse présente une analyse quantitative et comparative détaillée des effets sur le transport endo-lysosomal des polymorphes fibrillaires α -synF et α -synR, des fibrilles $A\beta$ et des oligomères $A\beta$, ajoutés à des neurones corticaux matures de souris en culture. Nous avons enregistré par vidéomi-

croscopie de fluorescence à haute cadence les déplacements des endosomes et des lysosomes en utilisant respectivement des nanocristaux de diamants fluorescents photostables et un marqueur lysosomal fluorescent, puis nous avons extrait et quantifié automatiquement, à haut débit, les caractéristiques de leur mouvement dirigé constitué de successions de phases de déplacement et de pauses. Tous les assemblages protéiques ont conduit à une forte diminution de la fraction d'endosomes et de lysosomes présentant un mouvement dirigé, ce qui devrait avoir un effet néfaste substantiel sur l'homéostasie des neurones. Nous avons également mis en évidence que ces assemblages protéiques pathogènes modifiaient différemment les paramètres du transport endo-lysosomal. Enfin, nous avons quantifié les paramètres de transport des compartiments chargés avec de tels assemblages marqués par un fluorophore et nous avons observé qu'ils ont un transport plus irrégulier que celui des endosomes et des lysosomes, présentant en particulier, des pauses plus fréquentes mais aussi plus courtes. Ces observations suggèrent que ces compartiments ont des caractéristiques moléculaires distinctes, mais des travaux supplémentaires sont nécessaires pour élucider leur nature précise. Nos travaux démontrent que les polymorphes fibrillaires d'alpha-syn, les fibrilles d' $A\beta$ et les oligomères altèrent le transport intraneuronal. Ces altérations pourraient résulter soit d'interactions directes des agrégats protéiques avec la « machinerie moléculaire » du transport intraneuronal, soit des changements d'homéostasie intracellulaire qu'ils provoquent.

Title: Impact of α -synuclein fibrillar strains and β -amyloid assemblies on cultured mouse cortical neurons endo-lysosomal logistics

Keywords: Alzheimer's disease, Parkinson's disease, toxic protein aggregates, primary cultures of neurons, intracellular transport, fluorescent nanodiamonds

Abstract: Impairment of axonal transport has recently emerged as a common characteristic of several neurodegenerative disorders (ND). Early impairments of intraneuronal transport has been thus proposed as a phenotypic trait common to ND, such as Alzheimer's (AD) and Parkinson's Disease (PD). There is compelling evidence that abnormal accumulation in the brain of misfolded proteins, including α -synuclein (α -syn) in PD and β -amyloid ($A\beta$) in AD, is a key pathophysiological mechanism underlying the neurotoxicity observed in these age-related disorders. Furthermore, the misfolded proteins gather to form non-soluble assemblies of different species, including fibrillar polymorphs (of fibril [α -synF] or ribbon [α -synR] type for α -syn, and fibril only for $A\beta$) or oligomer for $A\beta$. These different aggregates are suspected to underly the large spectrum of toxicity observed in ND. There is evidence that they impact the endosomal transport, which is essential in establishing neuronal compartments architecture, dynamics, and functions. However, few studies have compared in the same neurons the impact of the different assembly types and their own transport. This thesis presents a detailed quantitative and comparative analysis of the impact on endo-lysosomal transport of α -synF and α -synR fibrillar polymorphs, $A\beta$ fibrils, and $A\beta$ oligomers, externally applied on mature mouse cortical neurons in culture. We measured by fast fluorescence videomicroscopy endosomal and lysosomal transports using photostable fluorescent diamond nanocrystals and lysotracker dye, respectively, followed by the subsequent automatic extraction and quantification at high throughput of their directed motions constituted of the successions of displacements and pauses. All protein assemblies led to a large decrease in the fraction of endosomes and lysosomes having directed motion inside the neurons, which is expected to impact neuron homeostasis substantially. We further evidenced the differential impacts of these pathogenic protein assemblies on various parameters of endo-lysosomal transport. Finally, we were able to quantify the transport parameters of the compartments loaded with these assemblies and observed that they have a more irregular transport than endosomes and lysosomes, in particular, more frequent but also shorter pauses. These observations suggest that these cargoes have distinct molecular characteristics, but further work is necessary to elucidate their precise nature. Overall, our results point out that α -syn fibrillar polymorphs, $A\beta$ fibrils, and oligomers impair intraneuronal transport. We hypothesize that the polymorphs either interact directly with the intraneuronal transport molecular machinery or induce changes in intracellular homeostasis.

